

KINETIK DER LYMPHOZYTEN UND MONOZYTEN BEI LYMPHOGRANULOMATOSE

Peter Trumpp

1975

Aus der I. Medizinischen Abteilung
des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing

Chefarzt: Prof. Dr. H. Begemann

KINETIK DER LYMPHOZYTEN UND MONOZYTEN BEI
LYMPHOGRANULOMATOSE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwigs Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Peter Trumpp
aus München

München 1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Begemann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.1975



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Fallberichte	4
C. Methode	12
D. Kinetik der Lymphozyten bei Lymphogranulomatose	15
I. Ergebnisse	15
II. Diskussion	22
1. Umsatz der Blutlymphozyten	25
2. Elimination und Verweildauer der Lymphozyten im Blut	29
3. Verhält sich die Population der Blutlymphozyten umsatzkinetisch homogen?	31
4. Rückschlüsse auf die proliferierenden Vorläuferzellen der Blutlymphozyten	33
5. Lymphozyten-Produktion	38
III. Schlußfolgerung	40
E. Kinetik der Monozyten bei Lymphogranulomatose	43
I. Ergebnisse	43
II. Diskussion	46
1. Umsatz der Blutmonozyten	46
2. Elimination und Verweildauer der Monozyten im Blut	47
3. Kinetische Homogenität der Population der Blut-Monozyten	48
4. Zykluszeiten der Monozyten-Vorläuferzellen	49
5. Monozyten-Produktion	51

	Seite
III. Schlußfolgerung	53
F. Zusammenfassung	55
Literatur	57

Einleitung:

Die Lymphogranulomatose wurde erstmals 1832 von Thomas Hodgkin zusammen mit anderen Erkrankungen des lymphatischen Systems in ihrem Krankheitsbild beschrieben. 1897 wurde sie von Paltauf und Sternberg von anderen Erkrankungen mit Lymphknoten- und Milzschwellung histologisch und zytologisch abgegrenzt (28). Die Diagnostik hat sich weiter verfeinert und auf der Konferenz in Rye (N.Y. USA) wurden 1965 vier histologische Formen der Lymphogranulomatose unterschieden:

1. die lymphozytenreiche Form,
2. die Form der nodulären Sklerose,
3. die Form mit gemischter Zellularität und
4. die lymphozytenarme Form (13).

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Diagnose Lymphogranulomatose gestellt. Dies scheint nicht nur eine Folge der verbesserten Erkennungsmöglichkeiten sondern auch des häufigeren Auftretens zu sein. Bei der Lymphogranulomatose handelt es sich heute nicht mehr um eine seltene Krankheit, (3) deren Ätiologie und Pathogenese ist aber noch weitgehend ungeklärt.

Wir wollten mit unserer Arbeit versuchen, einen Baustein für das Verständnis der Lymphogranulomatose beizutragen. Ein zentraler Punkt im Ablauf der Erkrankung ist wohl die sehr häufige Lymphopenie. Neben den unspezifischen Symptomen wie Fieber und tastbaren Lymphknoten ist die Lymphopenie das konstanteste Symptom der Lymphogranulomatose. Schon bei der Erstmanifestation der Krankheit wird in 25 % der Fälle eine Lymphopenie im peripheren Blut beobachtet (3). Bezieht man jedoch alle Erkrankungsfälle mit ein, ergibt sich ein Anteil von rund 80 % (die Angaben schwan-

ken zwischen 60 % und 87 % (1, 2, 3, 5, 32, 33). Außerdem wurde in einer Autopsiestudie an einer großen Anzahl von Lymphogranulomatosepatienten in praktisch allen Fällen eine lymphopenische Situation gefunden (1).

Für die Überlegungen zu dieser Krankheit gewinnt die Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut jedoch auch deswegen eine so große Bedeutung, da nachgewiesen wurde, daß für ein größeres Kollektiv eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Lymphozyten und der durchschnittlichen Lebenserwartung der Patienten besteht (30). Dies ermöglicht allerdings nicht eine konkrete Aussage für den einzelnen Patienten; hierzu wäre notwendig, die Aktivität der Krankheit mit dem histologischen Typ und dem klinischen Ausbreitungsstadium und vor allem die Aktivität des lymphopoetischen Systems meßbar miteinzubeziehen.

Eine Änderung der absoluten Anzahl einer bestimmten Zellart in einem gegebenen System muß auf geänderten kinetischen Größen basieren. Es stellten sich für uns zwei Möglichkeiten für die Entstehung der Lymphopenie:

1. Es werden gegenüber dem Normzustand vermindert Lymphozyten produziert bzw. ins periphere Blut eingeschwenkt
2. es werden vermehrt Lymphozyten aus dem peripheren Blut eliminiert, d.h. die durchschnittliche Verweildauer der Lymphozyten im peripheren Blut wäre verkürzt.

Bei Personen ohne hämatologische Erkrankung ist festgestellt, daß das Kontingent der Blutlymphozyten sich aus zwei Fraktionen zusammensetzt, die sich kinetisch unterschiedlich verhalten. Die Zellen der einen Fraktion verweilen durchschnittlich 2 - 12 Tage im peripheren Blut und machen dort einen Prozentsatz von etwa 9 % der Gesamt-

zellzahl aus. Die Zellen der zweiten Fraktion verweilt 1 - 1,5 Jahre im peripheren Blut und stellt die übrigen 91 % der Lymphozyten (21, 24).

Aus dieser Kenntnis heraus differenziert sich unsere Fragestellung dahingehend: Gibt es auch bei der Lymphogranulomatose zwei kinetisch differente Lymphozytenfraktionen? Wenn ja, sind beide Fraktionen an der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung der Lymphopenie beteiligt, auf welche Art und in welcher Größenordnung?

Ähnliche Überlegungen gelten auch für die Monozytose, die als weiteres wenn auch selteneres Symptom der Lymphogranulomatose gilt (3). Es stellt sich uns die Frage, beruht die Monozytose auf einer leicht gesteigerten Mehrproduktion von Monozyten, wie sie auch bei unspezifischen Entzündungsreaktionen vorkommt, oder lassen sich spezifische kinetische Veränderungen aufzeigen?

Voraussetzung zur Beantwortung dieser Fragen ist, daß man folgende kinetischen Parameter der Lymphozyten und Monozyten bestimmen kann: - die **N e u p r o d u k t i o n** bzw. der **E i n s t r o m** neugebildeter Zellen ins periphere Blut und damit verbunden, bei konstantem Zellniveau, der **G e s a m t u m s a t z** dieser Zellen als Ausdruck der ständigen Zellerneuerung, - die durchschnittliche **V e r w e i l d a u e r** der Zellen im peripheren Blut mit der Frage nach dem Eliminationsprinzip, - die kinetische **H o m o g e n i t ä t** der beiden Zellarten.

Als geeignete Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, diese kinetischen Parameter für Lymphozyten und Monozyten

zu untersuchen, bietet sich uns die 1959 entwickelte Methode der ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung an (9). Das bei dieser Methode in-vivo applizierte, mit Tritium versetzte Thymidin wird nur von den proliferierenden Vorläufer-Zellen während der DNS-Synthese-Phase aufgenommen und schafft damit die Grundlage für die Bestimmung der vorgenannten kinetischen Parameter.

Fallberichte: (+)

Patient A.R.: (Klinisches Stadium IV B) (++)

Bei der 74-jährigen Patientin trat vor etwa einem Jahr an der linken Halsseite ein vergrößerter Lymphknoten auf, histologisch und zytologisch wurde aus dem drei Monate später exstirpierten Lymphknoten die Diagnose eines M. Hodgking gestellt. Klinische Untersuchungen, Röntgenaufnahme des Thorax und szintigraphische Darstellung der abdominalen Lymphknoten ergaben keinen sicheren Hinweis auf einen Befall im Sinne der Grundkrankheit. In Anbetracht des reduzierten Allgemeinzustandes wurde daher nur das linke Supraclavicularfeld mit 4.500 RMD bestrahlt. Seit 3 Monaten zunehmende Inappetenz, Müdigkeit und starker Gewichtsverlust; an der rechten Halsseite und in der linken Achselhöhle sind rasch zunehmende Lymphknotenschwellungen aufgetreten.

Folgende Befunde werden erhoben:

Reduzierter Allgemein- und Ernährungszustand, Fieber um 38°C , Lymphknotenvergrößerungen in den angegebenen Regionen, Leber und Milz nicht vergrößert tastbar, aus der

(+) Alle Zeitangaben in den Fallberichten beziehen sich auf den Beginn der Studie.

(++) Stadieneinteilung nach Rye (17)

Thoraxaufnahme ergibt sich kein Anhaltspunkt für mediastinale Lymphknotenschwellung. Die Röntgenaufnahme des Beckens legt den Verdacht auf einen Knochenbefall nahe, der szintigraphisch erhärtet wird.

Laborwerte:

BSG 75/110; Serum-Elektrophorese (Serumproteine 5,7 %): Albumin = 46,8 %, α_1 = 7,2 %, α_2 = 15,1 %, β = 12,2 %, γ = 18,7 %; Serumkupfer 187 μg %, Serumeisen 17 μg %; Hämoglobin 12,4 g % bei 4,55 Mill. Erythrozyten/ mm^3 ; Retikulozyten 25 %, Thrombozyten 93.000/ mm^3 , Leukozyten 11.000/ mm^3 , im Differentialblutbild 7 % Lymphozyten, 2 % Eosinophile, 0,2 % Stabkernige, 88,5 % neutrophile Segmentkernige, 1,2 % Monozyten, 1,0 % nichteinzuordnende Mononukleäre⁽⁺⁾.

Die Ausstriche des Knochenmarks zeigen keine spezifischen Veränderungen. Die beiden während der Studie aus der rechten Halsseite exstirpierten Lymphknoten zeigen histologisch wieder das Bild einer Lymphogranulomatose vom nodulär-sklerosierenden Typ.

Die Reaktion auf Tuberkulin (0,05 mg Alttuberkulin) und DNCB⁽⁺⁺⁾ waren negativ.

Während der Studie wurde die Patientin nicht behandelt.

(+) siehe unter Zytologie

(++) DNCB-Testung: 1, Vorsensibilisierung: auftragen von 0,1 ml einer 10 % DNCB-Aceton-Lösung auf die gereinigte Innenseite des Unterarms, wobei jeweils gewartet wird bis der letzte Tropfen aufgetrocknet ist. 2, Testung: 4 Wochen nach der Sensibilisierung wird im selben Verfahren 0,1%ige DNCB-Aceton-Lösung aufgetragen und nach 24 bzw. 48 Stunden abgelesen. Ist das Ergebnis negativ, wird die Testung mit 1%iger Lösung wiederholt.

Patient H.A.: (Klinisches Stadium III A)

Bei dem 33-jährigen Patienten zeigten sich vor etwa einem Jahr vergrößerte Lymphknoten an der linken Halsseite, deren histologische Untersuchung den Verdacht auf einen M. Hodgkin nahelegte. In der Folgezeit litt der Patient unter Schweißneigung, Engegefühl im Hals und Atemnot bei Anstrengung. Die erneute Exstirpation und histologische Untersuchung eines Lymphknotens an der linken Halsseite vor 3 Monaten sicherte nun die Diagnose einer Lymphogranulomatose vom nodulär sklerosierenden Typ.

Stationär werden jetzt folgende Befunde erhoben:

Kaum reduzierter Allgemeinzustand, Lymphknotenvergrößerungen beiderseits cervical und axillar, Leber nicht vergrößert tastbar; röntgenologisch zeigt sich eine Verbreiterung des Mediastinum und des rechten Hilus; die Milz ist nach dem Szintigramm mäßig vergrößert; die Befunde der Lymphangiographie sprechen für eine Mitbeteiligung der paraaortalen Lymphknoten.

Laborwerte: BSG 44/76; Serum-Elektrophorese (Serum-Proteine 7,1 g%): Albumin = 63,1 %, α_1 = 3,3 %, α_2 = 9,0 %, β = 8,2 %, γ = 16,4 %, Serumkupfer 186 μ g %, Serumeisen 33 μ g %, Hämoglobin 14,1 g % bei 5,18 Mill. Erythrozyten/ mm^3 ; Retikulozyten 9 % o; Thrombozyten 92.000/ mm^3 ; 15000 Leukozyten, 3 % Eosinophile, 0,7 % Stabkernige, 78,7 % neutrophile Segmentkernige, 5,2 % Monozyten, 1,5 % nichteinzuordnende Mononukleäre, 11 % Lymphozyten.

Das Knochenmark zeigt keine spezifischen Veränderungen. Die drei während der Studie entnommenen cervicalen Lymphknoten zeigen histologisch den nodulär-sklerosierenden Typ der Lymphogranulomatose.

Die Reaktion auf Tuberkulin ist negativ, die auf DNCB positiv.

Patient H.L.: (Klinisches Stadium IV B)

Vor sechs Jahren wurde bei dem jetzt 24-jährigen Mann eine Lymphogranulomatose im klinischen Stadium II diagnostiziert, die mit Bestrahlung der befallenen Lymphknoten-Gruppen der linken Halsseite und des Mediastinums behandelt wurde. Bereits drei Monate später wurde wegen der Erkrankungsausbreitung auf die paraaortalen Lymphknoten zytostatisch behandelt. Nach etwa zwei Jahren wurden die Lymphknoten-Gruppen der rechten Supraclavicularregion, ein Jahr später die axillaren und paraaortalen bestrahlt. Darauf folgte eine einjährige zytostatische Behandlung. Vor 18 Monaten wurde ein Befall der Leber nachgewiesen, kurze Zeit später zeigten sich auch Herde im Skelettsystem. Die Behandlung erfolgte teils radiologisch, teils mit Zytostatikakombinationen. Später wurden dann noch die Lymphknoten-Gruppen beider Kieferwinkel und der linken Leiste bestrahlt. Die Behandlung mit 50 mg Cyclophosphamid und 50 mg Ibenzmethylin pro Tag wurde erst 3 Tage vor der Studie abgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden folgende Befunde erhoben: Stark reduzierter Allgemein- und Ernährungszustand, subfebrile Temperaturen, keine tastbaren Lymphknotenschwellungen, die druckempfindliche Leber nicht vergrößert. Im linken Oberbauch tastet man einen faustgroßen Tumor, der sich bei der am siebten Tag der Studie vorgenommenen Laparatomie als derber, fibrotischer Konglomerattumor darstellt, in den Teile des Netzes mit einbezogen sind. Über das ganze Peritoneum findet man weisse, derbe Knötchen, die sich histologisch als Granulome vom sklerosierenden Typ darstellen. Die Milz hat etwa doppelte Normgröße.

Laborwerte: BSG 73/106; Serumelektrophorese (Serumproteine 6,0 g %) Albumin = 53,1 %, α_1 = 4,0 %, α_2 = 11,2 %, β = 9,1 %, γ = 20,3 %; Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transami-

nase und Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase 30 E/l, alkal. Phosphatase 290 E/l, Prothrombinindex 40%; Harnsäure im Blut 12,7 mg %, Serumkupfer 239 µg %; Serumeisen 27 µg %; Hämoglobin 8,4 g % bei 3,0 Mill. Erythrozyten/mm³; Retikulozyten 10 % o; Thrombozyten 63.000/mm³; Leukozyten 2.300/mm³; im Differentialblutbild 15 % Lymphozyten, 2,2 % Eosinophile, 4,6 % Stabkernige, 75,8 % neutrophile Segmentkernige, 1,6 % Monozyten, 0,8 % nicht einzuordnende Mononukleäre. In den Knochenmarksausstrichen werden keine spezifischen Veränderungen gefunden. Tuberkulin und DNCB erzeugen keine Reaktion. Zwei Monate nach Abschluß der Studie ist der Patient gestorben. Die Sektion ergab eine generalisierte Lymphogranulomatose vom lymphozytenarmen Typ mit Befall aller Lymphknoten, der Milz, Leber, des Skelettsystems, des Peritoneums und Mesenteriums.

Patient M.F.: (Klinisches Stadium IV B)

Anlässlich einer Routine-Durchleuchtung vor 2 Jahren fiel bei dem jetzt 38-jährigen Mann eine Verbreiterung des Mediastinums auf. Ein mediastinaler Lymphknoten zeigte histologisch das Bild einer Lymphogranulomatose. Daraufhin wurden die Halsregion, beide Supraclavicularfelder und das Mediastinum bestrahlt. Seit 9 Monaten leidet der Patient unter gürtelförmigen, von der Lendenwirbelsäule ausgehenden Leibschmerzen, unter Fieberschüben und Schweißneigung.

Folgende Befunde werden jetzt erhoben:

Etwas reduzierter Allgemeinzustand bei gutem Ernährungszustand; keine vergrößerten Lymphknoten tastbar, der Leberrand wird 8 cm unter dem rechten Rippenbogen, der untere Milzpol 5 cm unter dem linken Rippenbogen palpiert.

Die Röntgenaufnahme des Thorax zeigt jetzt keine pathologischen Veränderungen der Hili und des Mediastinums; die szintigraphischen Darstellungen der abdominalen Lymphknoten sprechen für einen Befall der inguinalen und paraaortalen Lymphknoten. Die histologische Untersuchung ergibt eine Lymphogranulomatose vom lymphozytenreichen Typ. Durch Laparaskopie und gleichzeitige Nadelbiopsie von Leber und Milz läßt sich ein Befall der Milz verifizieren, Leberherde sind nicht nachzuweisen. Die szintigraphische Darstellung des Skelettsystems spricht für Erkrankungsherde in der Lendenwirbelsäule und im Becken.

Laborwerte: BSG 112/130; Serum-Elektrophorese (Serumproteine 6,3 g %): Albumin = 41,4 %, α_1 = 5,5 %, α_2 = 15,6 %, β = 15,6 %, γ = 21,9 %; Serumkupfer 282 μ g %; Serumeisen 26 μ g %; Harnsäure im Blut 9,4 mg %; Hämoglobin 10,2 g % bei 3,83 Mill. Erythrozyten/ mm^3 ; Retikulozyten 21 % o; Thrombozyten 195.000/ mm^3 ; Leukozyten 5.200/ mm^3 , im Differentialblutbild 21 % Lymphozyten, 3 % Eosinophile, 0,2 % Stabkernige, 65,7 % neutrophile Segmentkernige, 7,2 % Monozyten, 3 % nicht einzuordnende Mononukleäre.

In den Ausstrichen des Knochenmarksaspirats finden sich keine spezifischen Veränderungen. Auf Tuberkulin und DNCB zeigen sich keine Hautreaktionen.

Zusammenfassung der wichtigsten klinischen Daten der Patienten:

	A.R.	H.A.	M.F.	H.L.
Alter	74 J.	33 J.	38 J.	24 J.
Geschlecht	weibl.	männl.	männl.	männl.
Klinisches Stadium(+)	IV B	III A	IV B	IV B
Histolog. Typ (+)	noduläre Sklerose	noduläre Sklerose	lymphozytenreich	lymphozytenarm
Lymphoz./mm ³	700	1650	1100	345
Monozyt./mm ³	108	775	335	40
Therapie	4500 RMD linkes Supraclavicu- larfeld vor 10 Mona- ten	---	Bestrahlung bei- der Supraclavi- cularfelder mit 4000 RMD und des Hals- u. Mediasti- nalfeldes mit 4500 RMD vor 20 Monaten	Bestrahlung großer Lymphkno- tenfelder und bis vor 3 Tagen zyto- statische Therapie

Diese Angaben bedeuten, daß in unserer Studie drei Fälle von aktiver Lymphogranulomatose (A.R., M.F. und H.L.) untersucht wurden. Der Patient H.A. hatte zu diesem Zeitpunkt eine relativ inaktive Lymphogranulomatose und war auch noch nicht bestrahlt oder zytostatisch behandelt worden. Neben H.A. kann auch die Patientin A.R. als unbehandelt betrachtet werden, da die Auswirkung der Bestrahlung einer einzigen Lymphknotenregion auf die Leukozytenvorgän-

(+) Einteilung der klinischen Stadien und der histologischen Typen entsprechend der Konferenz in Rye 1965 (17).

ge im gesamten Körper als gering veranschlagt werden können. Da die zytostatische Therapie von H.L. erst 3 Tage vor Beginn der Studie abgesetzt worden war, befand sich das hämatopoetische System bei dem Patient H.L. in einer Regenerationsphase.

Methode:

In-vitro-Markierung:

Vor der in-vivo-Applikation von ^3H -Thymidin wurde von jedem Patienten antikoaguliertes Blut in vitro mit ^3H -Thymidin ($1\ \mu\text{C}/\text{ml}$) eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die Anzahl DNS-synthetisierender, mononukleärer Zellen im Blut zu erfassen.

In-vivo-Markierung:

Jedem Patienten wurde eine intravenöse Injektion von $0,15\ \mu\text{C}$ ^3H -Thymidin (spez. Aktivität $5,0\ \text{C}/\text{mM}$; Radiochemical Centre Amersham, Great Britain) pro Gramm Körpergewicht verabreicht.

Termine der Blutentnahme nach ^3H -Thymidin-Gabe:

Innerhalb der ersten zwei Stunden wurden etwa acht Blutproben entnommen; danach folgten Abnahmen in stündlichen Abständen bis zur 12. Stunde, anschließend in 12-Stunden-Abständen bis zum Ende der ersten Woche und später in ein- bis zweitägigen Intervallen.

Aufarbeitung der Proben:

Von den Blutproben wurden zu jedem Zeitpunkt die Leukozytenzahlen mit einem Coulter Counter bestimmt, einfache Blutausstriche und Zellkonzentratausstriche hergestellt. Ein Zellkonzentrat wurde durch Zentrifugieren eines 1:1-Gemisches von EDTA und Plasmagellösung mit anschließender Abheberung des Überstandes gewonnen.

Die Ausstriche wurden 3 mal 10 Minuten in absolutem Alko-

hol fixiert, anschließend vier Stunden in fließendem Wasser gewässert und später mit Kodak AR 10 stripping film autoradiographiert. Nach einer Expositionszeit von 75 bis 116 Tagen (bei den in-vitro-Untersuchungen 14 Tage) wurden die Präparate entwickelt und danach mit Giemsa-Lösung gefärbt.

Zytologie:

Wir unterteilten die mononukleären Zellen in typische Lymphozyten, typische Monozyten und nicht einzuordnende mononukleäre Zellformen⁽⁺⁾. Die lymphatischen Zellen wurden anhand des mittleren Kerndurchmessers in drei Gruppen unterteilt:

kleine Lymphozyten (bis 8,4 μ), mittelgroße Lymphozyten (8,5 bis 9,9 μ) und große Lymphozyten (ab 10 μ). (3, 25)

Auswertung der Präparate:

Von den einfachen Blutaussstrichen wurden die Differentialbilder bestimmt. In den Zellkonzentrataussstrichen wurden pro Präparat 3000 lymphatische und 500 monozytäre Zellen ausgezählt. War die zu einem Zeitpunkt gezählte Anzahl an markierten Zellen für die Körnchenschwellenhalbierungszeit zu klein, wurden weitere markierte Lymphozyten und Monozyten ausgewertet. Über jedem Zellkern wurden die Sil-

(+) Bei der Lymphogranulomatose treten gehäuft mononukleäre Zellformen auf, die in ihrer Erscheinungsform nicht eindeutig dem lymphozytären oder dem monozytären System zugeordnet werden können. Um eine Aussage über eindeutige Lymphozyten und Monozyten treffen zu können, haben wir die Fraktion der nicht-einzuordnenden mononukleären Zellformen abgetrennt.
(4, 11, 17, 23, 29)

berkörnchen gezählt. In ^3H -Thymidin-freien Kontrollpräparaten zählten wir über den Zellkernen im allgemeinen 0 - 1 Silberkörnchen. In maximal 0,3 % der großen Zellen stieg die Anzahl der Silberkörnchen auf 9 an. Wir legten daher eine Background-Schwelle von 9 Silberkörnchen pro Zellkern fest und werteten alle Zellen als markiert, über deren Zellkern mehr als 9 Silberkörnchen gezählt wurden.

Zu jedem Zeitpunkt bestimmten wir anhand der Relation von markierten Zellen zur Gesamtzahl einer Zellklasse den Markierungsindex (MI) und errechneten die mittlere Körnchenzahl pro Zelle (MCG) für die markierten Zellen einer Zellklasse.

Kinetik der Lymphozyten bei Lymphogranulomatose:

Ergebnisse:

Die Verteilung der Lymphozyten im Blut ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Lymphozytenzahlen und ihre prozentuale Aufteilung zeigen bei den Patienten A.R., M.F. und H.A. während der Studie nur geringe Schwankungen. Eine Ausnahme ist der Patient H.L., dessen Lymphozytenzahl in den ersten zwei Tagen nach der ³H-Thymidin-Pulsmarkierung um ungefähr 40 % ansteigt.

	A.R.	H.A.	M.F.	H.L.
Prozentsatz der Lymphozyten im Blut	6,5	11,5	21,0	14,5
relativer Prozentsatz der kleinen LZ	39,5	61,5	53,5	17,5
der mittelgr.	45,5	32,0	32,5	43,5
der großen LZ	15,0	6,5	14,0	39,0

Tabelle 1: Verteilung der Lymphozyten im Blut zu Beginn der Studie

In-vitro-Markierung:

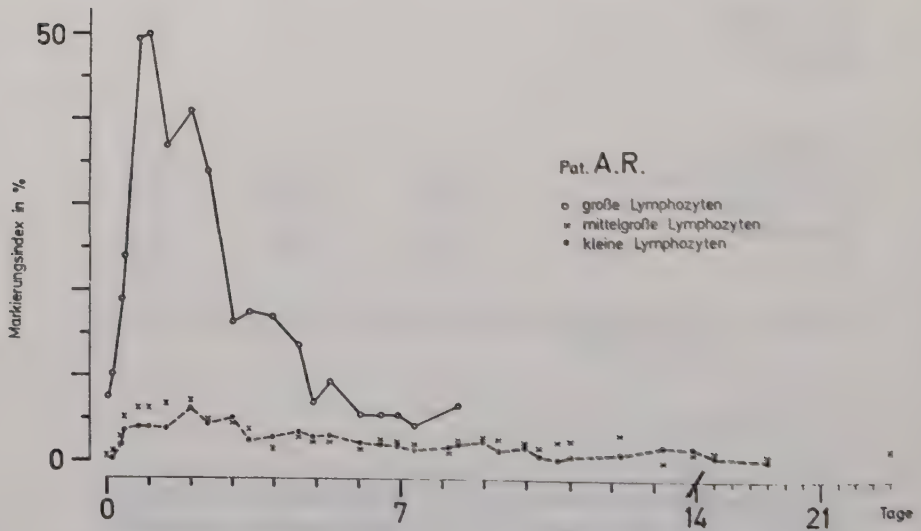
In den Zellausstrichen nach In-vitro-Markierung fanden wir bei allen vier Patienten nur große und mittelgroße, markierte Lymphozyten: 3,3 % der großen und 0,2 % der mittelgroßen Lymphozyten bei H.A., 4,5 % und 0,6 % bei A.R.,

5,9 % und 0,4 % bei H.L., und 13,4 % und 2,3 % bei M.F. Demnach sind im Durchschnitt 6,8 % der großen und 0,9 % der mittelgroßen Lymphozyten im peripheren Blut in DNS-Synthese.

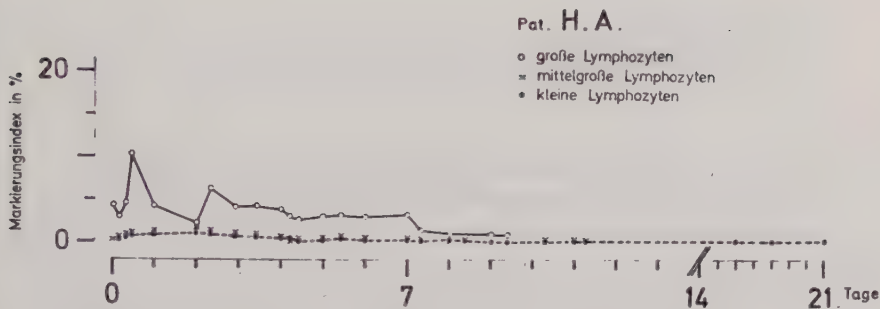
In-vivo-Markierung (s. Fig. 1 - 6):

Die Ergebnisse der großen Blutlymphozyten ($\geq 10,0 \mu$):

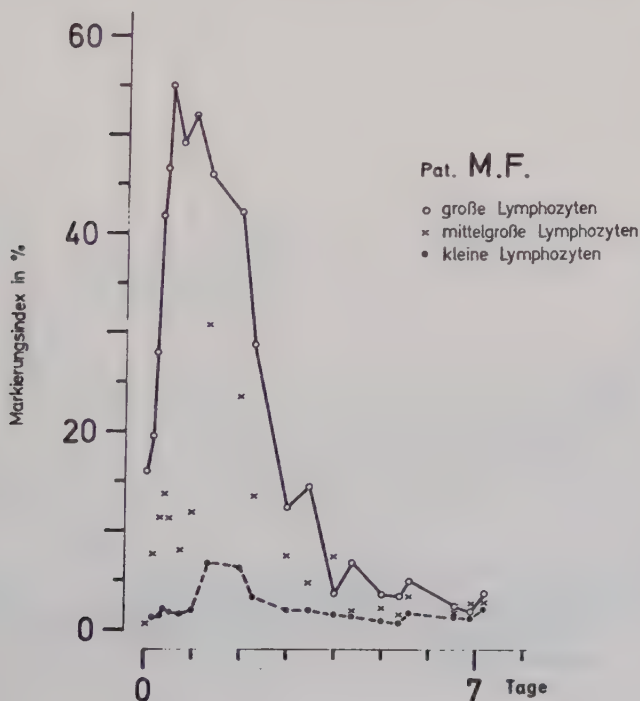
Wie wir nach den Ergebnissen der in-vitro-Markierung erwarten, finden wir in den ersten Proben, zehn Minuten nach der ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung, eine relevante Anzahl großer, markierter Lymphozyten. Der Markierungsindex zu diesem Zeitpunkt ist 4,3 % (H.A.), 5,3 % (H.L.), 8,4 % (A.R.) und 16,1 % (M.F.).



Figur 1: Patientin A.R.: Verlauf der Markierungsindexkurven der kleinen, mittelgroßen und großen Lymphozyten nach ^3H -Thymidin-Gabe.



Figur 2: Patient H.A.: Verlauf der Markierungsindexkurven der kleinen, mittelgroßen und großen Lymphozyten nach ^3H -Thymidin-Gabe.

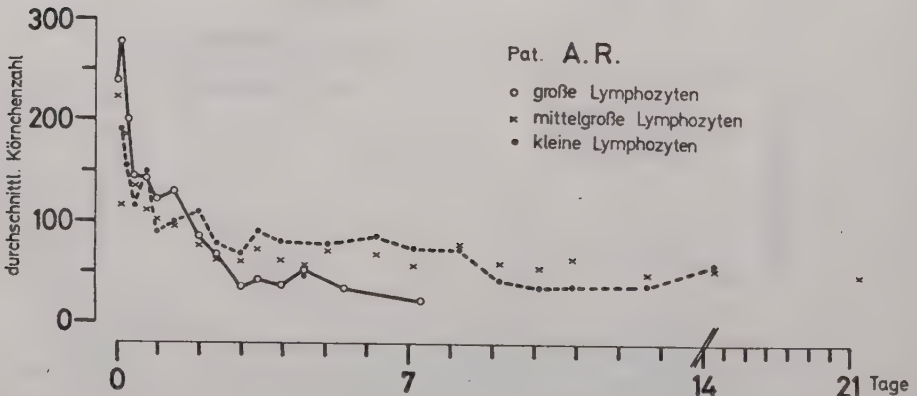


Auf Vorderseite:

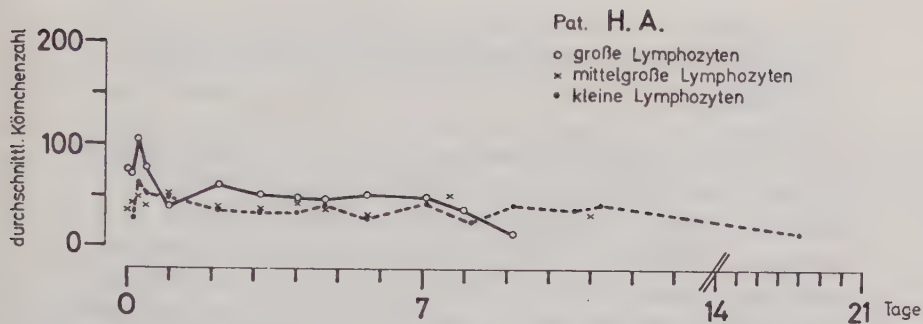
Figur 3: Patient M.F.: Verlauf der Markierungsindexkurven der kleinen, mittelgroßen und großen Lymphozyten nach ^3H -Thymidin-Gabe.

Bis zur dritten Stunde bleiben diese Werte etwa konstant. Daraufhin steigt der Markierungsindex steil an und erreicht einen ersten Gipfel mit 13,6 % (H.A.) und 55,0 % (M.F.) zur 12. Stunde und mit 26,7 % (H.L.) und 50,0 % (A.R.) zur 18. Stunde. (s. Fig. 1 - 3) Nach einem zweiten Gipfel, der zwischen der 24. und der 56. Stunde liegt, fällt der Markierungsindex wieder ab, zuerst schneller, später langsamer.

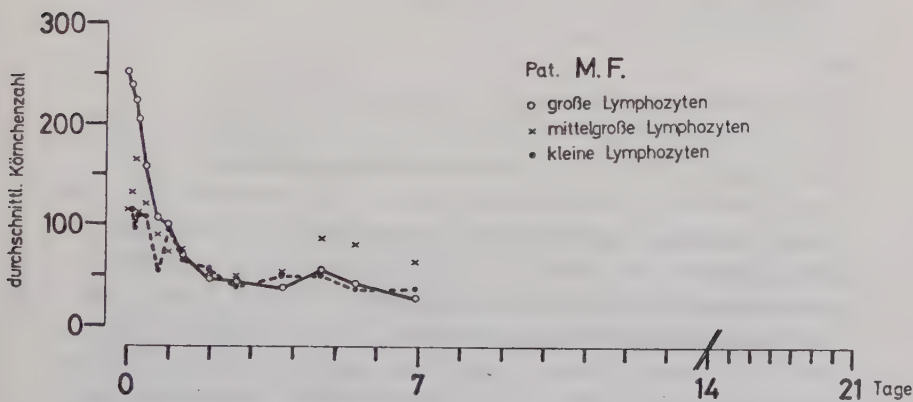
Die Markierungsintensität steigt z.T. bis zu 8. Stunde (A.R. und H.A.) an und fällt dann zuerst steiler, später flacher ab (s. Fig. 4 - 6).



Figur 4: Patientin A.R.: Verhalten der durchschnittlichen Körnchenzahl pro markiertem Zellkern nach ^3H -Thymidin-Gabe.



Figur 5: Patient H.A.: Verhalten der durchschnittlichen Körnchenzahl pro markiertem Zellkern nach ^3H -Thymidin-Gabe.



Figur 6: Patient M.F.: Verhalten der durchschnittlichen Körnchenzahl pro markiertem Zellkern nach ^3H -Thymidin-Gabe.

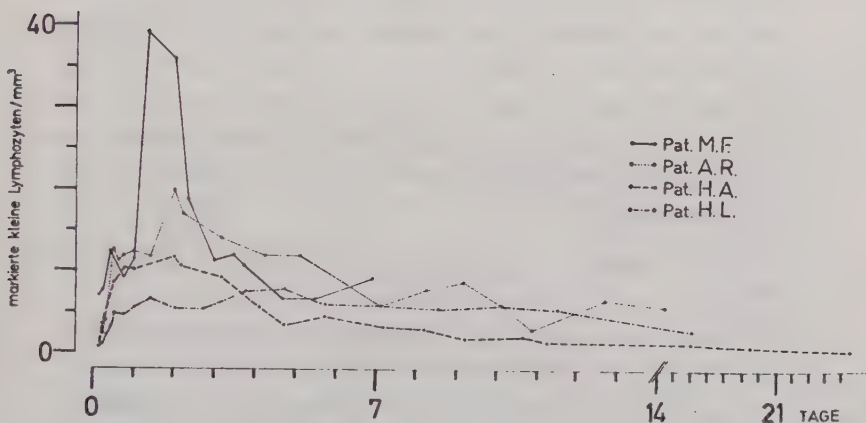
Die Ergebnisse der mittelgroßen Blutlymphozyten (8,5 - 9,9 μ):

Mittelgroße, markierte Lymphozyten werden ebenso früh wie große im peripheren Blut gefunden. In den ersten drei Stunden sind durchschnittlich 0,19 % (H.A.), 0,6 % (A.R. und H.L.) und 0,9 % (M.F.) der mittelgroßen Lymphozyten markiert. Danach folgt ebenfalls ein steiler Anstieg mit einem ersten Gipfel nach 10 bis 12 Stunden und einem zweiten nach 24 bis 48 Stunden (s. Fig. 1 - 3). Der dabei erreichte Höchstwert des Markierungsindex beträgt bei H.A. 1,7 %, bei A.R. 7,2 %, bei H.L. 13,9 % und bei M.F. 30,8 %. Der anschließende Abfall des Markierungsindex erfolgt zuerst schneller, später langsamer. Bei den Patienten A.R. und H.A. scheint die Anzahl der markierten mittelgroßen Lymphozyten ab der 60. Stunde gleich zu bleiben. Die letzten mittelgroßen Lymphozyten werden am 11. Tag (H.A.) und am 25. Tag (A.R.) gefunden.

Die Ergebnisse der kleinen Lymphozyten (< 8,5 μ):

Die ersten, markierten, kleinen Lymphozyten werden nach drei Stunden (A.R. und H.L.) bzw. nach 4 Stunden (M.F. und H.A.) nach der ³H-Thymidin-Pulsmarkierung im peripheren Blut gefunden (s. Fig. 1 - 3). Danach steigt der Markierungsindex steil an und erreicht einen ersten Gipfel mit 2,1 % markierte kleine Lymphozyten nach 10 Stunden (M.F.), mit 4,3 % (A.R.) bzw. 7,5 % (H.L.) nach 12 Stunden und mit 1,0 % nach 18 Stunden (H.A.). Es scheint, daß diesem ersten Gipfel in allen Fällen ein leichter Abfall und daraufhin ein zweiter Gipfel folgt, bei M.F. mit 6,7 % und bei H.L. mit 8,2 % zur 34. Stunde und bei H.A. mit 1,1 % und bei A.R. mit 6,2 % zur 48. Stunde (s. Fig. 7).

Nach dem zweiten Gipfel fällt der Markierungsindex ebenso wie bei den anderen Lymphozyten zuerst schnell, dann langsam ab. Bei Patient H.A. erscheint die Anzahl der markierten kleinen Lymphozyten ab der 70. Stunde konstant.



Figur 7: Auftreten und Verschwinden der markierten, kleinen Lymphozyten im Blut der vier Patienten mit Lymphogranulomatose.

Am Ende der Beobachtungszeit von 7 Tagen waren bei M.F. noch 1,6 % der kleinen Lymphozyten markiert, bei H.L. nach 18 Tagen noch 3,7 %. Dagegen konnten bei A.R. nach 18 Tagen und bei H.A. nach 21 Tagen keine markierten kleinen Lymphozyten mehr entdeckt werden.

Die Konzentration markierter kleiner Lymphozyten pro mm³ Blut wird in Figur 7 dargestellt.

Diskussion:

Die Methode der ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung basiert auf folgenden Prämissen, die von Cronkite et. al. 1959 formuliert wurden (9):

- der an das inkorporierte Thymidin gekoppelte Tritiumgehalt ändert sich nicht
- mit Tritium markiertes Thymidin wird direkt nach der Injektion gleichmäßig über den ganzen Körper verteilt und innerhalb kurzer Zeit entweder zur DNS-Synthese verwendet oder abgebaut
- in DNS inkorporierte Thymidinbase unterliegt keinem Austausch
- DNS unterliegt ausschließlich während der Zellteilung und dem Zelltod einem Umsatz
- Die Reutilisation von mit Tritium markierten Material bei der DNS-Synthese ist bedeutungslos.
- Die Strahlenschädigung der Zellen durch das inkorporierte radioaktive Material ist so gering, daß der normale Verlauf der Zellen bis zum Zelltod ungestört verfolgt werden kann.

Wenn diese Prämisse gelten, können durch eine In-vivo-Markierung mittels einer einmaligen intravenösen Injektion von ^3H -Thymidin folgende auf der Proliferation von Vorläuferzellen beruhende kinetischen Parameter bestimmt werden:

1. Der Einstrom und die Einstromrate:

In ein bestimmtes Blutvolumen strömt innerhalb einer gegebenen Zeiteinheit eine bestimmte Anzahl neugebildeter Zellen ein. Die absolute Anzahl bestimmt den Ein-

strom, das Verhältnis dieser Zahl zur Gesamtzellzahl entspricht der relativen Einstromrate.

2. Die Zellproduktion:

Sie umreißt die Zahl neugebildeter Zellen, die vom proliferierenden Gewebe ins periphere Blut in einer bestimmten Zeiteinheit einströmen.

3. Die Halbwertszeit:

In einem Zellsystem, dessen Zellen abhängig von ihrem Alter eliminiert werden, kann die Lebensdauer der Einzelzellen umrissen werden. Verlassen die Zellen das Blut nach dem Gesetz des Zufalls, kann die Halbwertszeit bestimmt werden. Sie benennt die Zeit, in der die Hälfte der zu einem bestimmten Zeitpunkt markierten Zellen das Blut verlassen hat.

4. Die mittlere Verweildauer:

Sie bezeichnet die Zeit, die die Zellen einer Population durchschnittlich im Blut bleiben.

5. Der Umsatz und die Umsatzrate:

Dem Einstrom neugebildeter Zellen steht eine Elimination von Zellen entgegen. In einem definierten Zellkompartiment, dessen Gesamtzellzahl im Untersuchungszeitraum gleichbleibt, entspricht die Größe der Elimination der des Einstroms neugebildeter Zellen. Diesen Vorgang nennt man Umsatz; das Verhältnis der umgesetzten Zellzahl pro Zeiteinheit zur Gesamtzellzahl bestimmt die Umsatzrate.

6. Die Zellzykluszeiten der Vorläuferzellen:

Ein Zellzyklus proliferierender Zellen setzt sich aus vier Phasen zusammen, der postmitotischen Ruhephase

(G1-Phase), der DNS-Synthese-Phase (S-Phase), der praemitotischen Ruhephase (G2-Phase) und der Mitose. Die Tochterzellen eines solchen Zyklus sind wiederum proliferierende Zellen; es besteht eine Vorläuferreihe. Durch die wiederholten Teilungen in Tochterzellen ergibt sich innerhalb der Vorläuferreihe ein multiplikativer Vorgang. Umfaßt das Vorläuferkompartiment beispielsweise eine Folge von zwei Zellzyklen, bezeichnet man die unreiferen Vorläuferzellen als Vorläufer-II-Zellen, die reiferen als Vorläufer-I-Zellen (s. a. Fig. 8).

Die Berechnung dieser kinetischen Parameter bei ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung setzt aber voraus, daß Einstromrate in das Blutkompartiment und Eliminationsrate für Lymphozyten im gleichen Größenbereich liegen und damit die Anzahl der Lymphozyten pro Kubikmillimeter Blut konstant bleibt. Bei drei Patienten (A.R., H.A. und M.F.) ist diese Voraussetzung gegeben. Der Patient H.L. befindet sich in einer Regenerationsphase der Blutzellbildung, da erst drei Tage vor Beginn der Studie die zytostatische Therapie abgesetzt worden war. Die meisten Daten dieses Patienten erlauben daher nur qualitative und keine quantitativen Rückschlüsse.

Umsatz der Blutlymphozyten:

Die proliferierenden Zellen der mononukleären Zellstämme bauen während der gesamten DNS-Phase Thymidin ein (s. Fig. 8). Wir nehmen, wie einige andere Autoren (10, 14, 15) an, daß durch eine einmalige Injektion von ^3H -Thymidin alle zu diesem Zeitpunkt in DNS-Synthese befindliche Zellen markiert werden. Nach einem bestimmten Zeitraum treten deren Tochter-Zellen ins periphere Blut über. Dieser Einstrom erfolgt linear (s. Fig. 1 - 3). Dementsprechend können wir annehmen, daß der Einstrom markierter Zellen dem tatsächlichen Einstrom aller neugebildeter Zellen gleichzusetzen ist.

Zur Bestimmung der Einstromrate von Lymphozyten untersuchen wir also den initialen Anstieg des Markierungsindex von Lymphozyten nach ^3H -Thymidin-Injektion. Aus technischen Gründen kann man die größte Annäherung an den tatsächlichen Wert erreichen, wenn von diesem initialen Anstieg das steilste Stück berechnet wird⁽⁺⁾ (14). Entsprechend diesem steilsten Stück finden wir für die kleinen Lymphozyten Einstromraten von 0,07 % /Stunde (H.A.), 0,16 % /Stunde (M.F.), 0,45 % /Stunde (A.R.) und 0,78 % /Stunde (H.L.). Die Einstromrate der mittelgroßen Lymphozyten sind 0,1 % /Stunde (H.A.), 0,44 % /Stunde (A.R.), 1,04 % /Stunde (M.F.) und 1,3 % /Stunde (H.L.). Die größten Einstromraten werden bei den großen Lymphozyten gemessen: 1,28 % /Stunde (H.A.), 1,49 % /Stunde (H.L.), 2,67 % /Stunde (A.R.) und 4,11 % /Stunde (M.F.).

Bei den Patienten H.A., M.F. und A.R. kann die Einstromrate gleich der mittleren Umsatzrate gesetzt werden, da bei diesen Patienten im Untersuchungszeitraum das Niveau an Lymphozyten gleich blieb. Die Umsatzwerte des Patienten

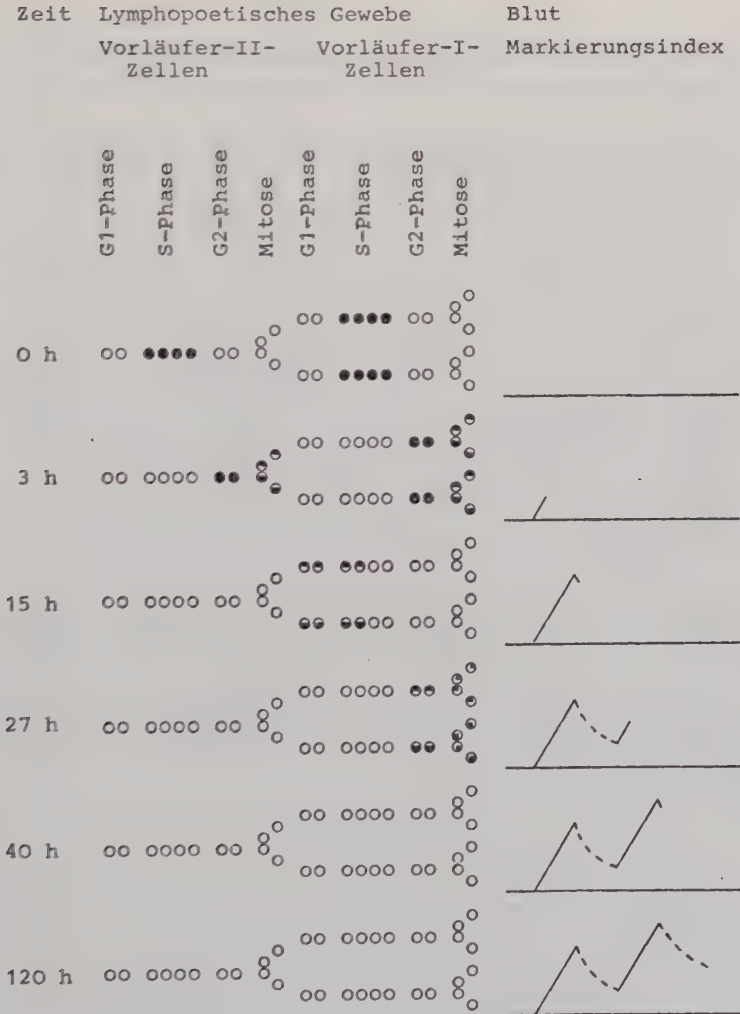
(+) Wenn zum Zeitpunkt des steilsten Anstiegs des Markie-

H.L. können wegen der ansteigenden absoluten Lymphozytenzahlen nicht errechnet werden.

Die mittlere Umsatzzeit erhält man, wenn man anhand eines bestimmten Prozentsatzes an Umsatz pro Stunde (entsprechend der Umsatzrate) errechnet, in wieviel Stunden 100 Prozent des Zelniveaus erreicht werden.

Das bedeutet bei einer Umsatzrate für die kleinen Lymphozyten von 0,07 %/Stunde (H.A.) errechnet sich eine Umsatzzeit von 1582 Stunden, entsprechend 66 Tagen; bei 0,16 %/Stunde (M.F.) eine Umsatzzeit von 17 Tagen und bei 0,45 %/Stunde (A.R.) eine Umsatzzeit von 10 Tagen. Für die großen Lymphozyten errechnen sich auf die gleiche Art Umsatzzeiten von 3,2 Tagen (H.A.) 1,6 Tagen (A.R.) und 1,0 Tagen (M.F.). Die Werte der mittelgroßen Lymphozyten rangieren zwischen denen für große und kleine Lymphozyten.

(+) Forts.: rungsindex nicht nur markierte Lymphozyten ins Blut einströmen, sind die hier angegebenen Zahlen für die Einstromrate zu niedrig und die für die Umsatzzeit zu hoch gerechnet.



Figur 8: Graphische Darstellung des Ablaufs der Zellentwicklung der Lymphozytenvorläufer nach ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung ($t=0$) in Korrelation mit dem Auftreten von markierten Lymphozyten im peripheren Blut, ausgedrückt in Form des Markierungsindex (theoretischer Verlauf). (Die Schwärzung auf der Zeichnung entspricht der Markierung.)

Ein Vergleich dieser Daten mit normalen Werten ist nur insoweit möglich, als er die kleinen Lymphozyten erfaßt, da bis jetzt für große und mittelgroße Lymphozyten keine korrespondierenden Parameter bei Patienten ohne hämatologische Erkrankung bestimmt wurden. Die Umsatzrate von kleinen Lymphozyten war bei einer Patientin mit Glioblastom und normalem Blutbild 0,9 %/Tag (25). Dies ist beträchtlich weniger als die Umsatzrate der kleinen Lymphozyten bei den Lymphogranulomatose-Patienten M.F. und A.R. mit 3,7 %/Tag bzw. 10,7 %/Tag. Ob der Patient H.A. mit einer Umsatzrate von 1,5 %/Tag sich signifikant von den Normalwerten unterscheidet, kann noch nicht entschieden werden. Entsprechend der erhöhten Umsatzrate, sind die durchschnittlichen Umsatzzeiten bei den Patienten A.R. (10 Tage) und M.F. (17 Tage) bedeutend kürzer als bei der oben erwähnten Patientin mit Glioblastom. Die Umsatzzeiten der kleinen Lymphozyten dieser Patientin und dreier anderer hämatologisch normalen Krebspatienten (22) belaufen sich auf 70 - 115 Tage. Der Patient H.A. steht mit einer Umsatzzeit von 66 Tagen zwischen den Werten von 'Normalpersonen' und den Lymphogranulomatose-Patienten A.R. und M.F.

Elimination und Verweildauer der Lymphozyten im Blut:

Die Berechnung der Verweildauer einer Zellart in einem gegebenen Kompartiment ist abhängig von der Art der Elimination. Bei unserem Versuch ergibt sich ein direkt nach dem Einstrom einsetzender Abfall der markierten Zellen, der zuerst schnell, später langsamer erfolgt (s. Fig. 1 - 3). Trägt man die gefundenen Werte dieses Abfalls⁽⁺⁾ in ein semilogarithmisches Koordinatensystem ein, erhält man eine Gerade. Diese Gerade entspricht einem exponentiellen Abfall der markierten Lymphozyten. Das bedeutet, die Elimination der Lymphozyten aus dem peripheren Blut erfolgt zufällig (random-loss-Prinzip) und unabhängig vom Alter. Es kann der Zeitraum bestimmt werden, in dem die Hälfte der markierten Zellen aus dem peripheren Blut verschwindet.

Diesen Zeitraum nennt man Halbwertszeit. Wir ermitteln in unserem Versuch für die Lymphozyten folgende Halbwertszeiten: für die großen Lymphozyten 0,84 Tage (A.R. und M.F.) 0,97 (H.A.) und 1,9 Tage (H.L.), für die mittelgroßen Lymphozyten 0,9 Tage (M.F.), 1,6 Tage (A.R.) und 1,7 Tage (H.A.) (bei H.L. ist der Abfall der Markierungsindexkurve nicht eindeutig exponentiell), und für die kleinen Lymphozyten 1,6 Tage (M.F.), 2,5 Tage (H.A.), 3,8 Tage (A.R.) und 7,4 Tage (H.L.) (s. Fig. 9). Bei dem Patienten H.A. existiert offensichtlich eine kleine Fraktion von großen, mittelgroßen und kleinen Lymphozyten, die wesentlich lang-

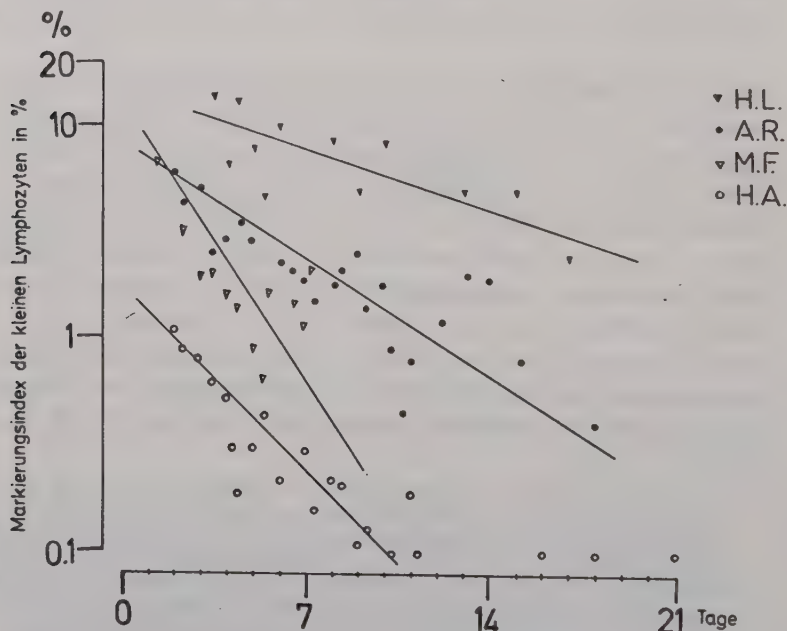
(+) Die Elimination der markierten Tochterzellen der Vorläufer-I-Zellen wird, wie wir später darstellen, von dem Einstrom der Tochterzellen der Vorläufer-II-Zellen überlagert (s. a. Fig. 8). Diese Zellen sind niedriger markiert. Um eine Verzerrung der Elimination durch diesen schubweisen Einstrom aus der Vorläuferreihe möglichst zu vermeiden, errechnen wir die Halbwertszeit anhand der höchstmarkierten Zellen der Tochterzellen der Vorläufer-I-Zellen (14).

samer aus dem Blut verschwinden. Sie ist allerdings so klein, daß eine Bestimmung der Halbwertszeit nicht möglich ist.

Aus dieser Halbwertszeit errechnet sich die mittlere Verweildauer nach der Formel:

$$\text{Verweildauer} = \text{Halbwertszeit} / \ln 2 \quad (14)$$

Entsprechend dieser Formel finden wir für die großen Lymphozyten eine mittlere Verweildauer von 1,2 Tagen (A.R.), von 1,4 Tagen (H.A.) und von 2,7 Tagen (H.L.). Die mittelgroßen Lymphozyten verweilen durchschnittlich 1,3 Tage (M.F.), 2,3 Tage (A.R.) und 2,45 Tage (H.A.), und die kleinen Lymphozyten 2,3 Tage (M.F.), 3,6 Tage (H.A.), 5,5 Tage (A.R.) und 10,6 Tage (H.L.).



Figur 9: Semilogarithmische Darstellung des Abfalls des Markierungsindex der kleinen Blutlymphozyten bei den vier Patienten.

Verhält sich die Population der Blutlymphozyten umsatzkinetisch homogen?

Wenn innerhalb eines Zellsystems alle Zellen sich kinetisch gleich verhalten, so wird die gesamte Population dieses Kompartments in einer Zeit umgetauscht, die der mittleren Verweildauer dieser Zellen entspricht. Übersteigt jedoch die Umsatzzeit die mittlere Verweildauer, so beweist das, daß außer der kurzlebigen Zellfraktion, deren Verweildauer anhand des Abfalls der Markierungsindekkurve bestimmt werden kann, eine weitere Fraktion von wesentlich langlebigeren Zellen in das Blutkompartiment einströmt.

In unserer Untersuchung ergeben sich für die kleinen und mittelgroßen Lymphozyten eine Differenz zwischen der Umsatzzeit und der mittleren Verweildauer. Wir finden bei den kleinen Lymphozyten eine Umsatzzeit von 10, 17 bzw. 66 Tagen und eine mittlere Verweildauer von 5,5, 2,3 und 3,6 Tagen. Unterschiede ähnlicher Größenordnung bestehen auch bei den mittelgroßen Lymphozyten. Demnach wird nur ein Teil der kleinen und mittelgroßen Lymphozyten entsprechend der mittleren Verweildauer sehr rasch umgesetzt, während der andere Teil wesentlich langsamer eliminiert wird. Der Prozentsatz an kurzlebigen Zellen errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Fraktion der kurzlebigen Zellen in Prozent} = \frac{\text{Verweildauer}}{\text{Umsatzzeit}} \times 100$$

Demnach machen die kleinen Lymphozyten mit einer Verweildauer von 2,3 - 5,5 Tagen einen Prozentsatz von 5,5 % (H. A.), 13,5 % (M.F.) und 55 % (A.R.) der gesamten Population der kleinen Lymphozyten aus. Ähnliches gilt wiederum für die mittelgroßen Lymphozyten, während sich bei den großen

Lymphozyten bei den Patienten M.F. und A.R. vergleichbare Umsatz- und Verweilzeiten ergeben und damit als kinetisch homogen anzusehen sind. Bei Patient H.A. scheinen nur 44 % der großen Lymphozyten 1,4 Tage im peripheren Blut zu verweilen; die übrigen großen Blutlymphozyten zeigen offensichtlich einen langsameren Umsatz.

Faßt man alle kurzlebigen Lymphozyten zusammen, ergibt sich bei Patient H.A. ein Prozentsatz von 10,0 %, bei M.F. 35,5 % und bei A.R. 48,6 %, dies entspricht bei den angegebenen absoluten Lymphozyten-Zahlen einem Niveau an kurzlebigen Lymphozyten von 170, 390 bzw. 340 Lymphozyten/mm³. Die durchschnittliche Verweildauer dieser kurzlebigen Lymphozyten im peripheren Blut beträgt zwischen 1 und 5,5 Tagen. Dementsprechend entfallen auf die Fraktion der langlebigen Lymphozyten 90,0 % (H.A.), 64,5 % (M.F.) und 51,4 % (A.R.). Bei der Patientin mit Glioblastom dagegen ergibt sich ein Verhältnis der kurzlebigen zu den langlebigen von 9,1 % zu 90,9 %, wobei die kurzlebigen eine durchschnittlich Verweildauer im Blut von (2) - 12 Tagen haben (24).

Rückschlüsse auf die proliferierenden Vorläuferzellen der Blutlymphozyten:

Die proliferierende Vorläuferzellreihe besteht aus zwei hintereinander geschalteten Zellzyklen. Jeder Zellzyklus besteht aus vier Phasen, der G1-Ruhephase, der DNS-Synthesephase, der G2-Ruhephase und der Mitose (s. Fig. 8). Da dieser Entwicklungsprozeß kontinuierlich stattfindet, gibt es zu jedem Zeitpunkt proliferierende Lymphozyten-Vorläuferzellen, die in der G1- oder G2-Ruhephase sind, Zellen die DNS synthetisieren und Zellen, die sich teilen, und außerdem reife Lymphozyten.

Bei einer ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung werden nur diejenigen Zellen markiert, die sich zu diesem Zeitpunkt in DNS-Synthese befinden; alle anderen bleiben unmarkiert. Es gibt also dann markierte Anteile der Lymphozyten-Vorläufer und ummarkierte. Da alle Zellen den zeitlich gerichteten Prozeß der Zellentwicklung über die verschiedenen Phasen durchlaufen müssen, werden also die ersten markierten Lymphozyten dann im Blut erscheinen, wenn die Vorläufer-I-Zellen, die zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung gerade noch in DNS-Synthese waren, die G2-Ruhephase und die Mitose durchlaufen haben und in das Blut ausgeschwemmt werden. Demnach entspricht der Zeitraum bis diese markierten Zellen im Blut erscheinen der Dauer der G2-Ruhephase, der Mitose und einer eventuellen Ausschwemmzeit (s. Fig. 8) (10, 33).

In der Folge werden solange markierte Tochterzellen ins Blut einströmen, bis die Vorläufer-I-Zellen, die zu dem Zeitpunkt der Pulsmarkierung gerade in die DNS-Synthesephase eingetreten waren und noch markiert wurden, in das Blut übertreten. Demnach entspricht der Zeitraum vom er-

sten gehäuftesten Auftreten von markierten Lymphozyten bis zum ersten Gipfel des Markierungsindex der Dauer der DNS-Synthese-Phase (s. Fig. 8).

Nach dieser Zeit gelangen unmarkierte Tochterzellen ins Blut. Sie stammen von Vorläufer-I-Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung in der G1-Ruhephase befanden, sowie von Vorläufer-II-Zellen, die in der Mitose bzw. G2-Ruhephase gewesen sind. Da deshalb mehrere Stunden keine markierten Lymphozyten ins Blut einströmen, sinkt der Markierungsindex dann deutlich ab, wenn eine rasche Elimination der Zellen erfolgt. (s. Fig. 8) Danach strömen wiederum markierte Zellen ins Blut ein, wenn die Tochterzellen der Vorläufer-II-Zellen, die zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung in DNS-Synthese waren, zur Reifung kommen. Und es entsteht in der Folge ein zweites Maximum an markierten Zellen im Blut, entsprechend dem zweiten Gipfel im Markierungsindex (s. Fig. 8). Der Zeitraum zwischen den zwei Gipfeln im Markierungsindex reicht vom Anfang der DNS-Synthesephase der Vorläufer-I-Zellen bis zum Anfang der DNS-Synthesephase der Vorläufer-II-Zellen und umfaßt also folgende Zyklusabschnitte der Vorläuferzellen: G1-Ruhephase der Vorläufer-I-Zellen, Mitose, G2-Ruhephase und DNS-Synthesephase der Vorläufer-II-Zellen; d.h. also, daß der Abstand zwischen zwei Gipfeln im Markierungsindex ein Maß für die Generationszeit der Lymphozytenvorläuferzellen ist (s. Fig. 1 - 3) (15, 18).

Bei der Entwicklung bis zur Reife durchlaufen die Vorläufer-II-Zellen zwei Teilungen, während sich die Vorläufer-I-Zellen nur einmal teilen. Bei jeder Teilung wird die gebildete Menge an DNS von der Mutterzelle auf zwei Tochterzellen übertragen. Bei den markierten Zellen gilt das ebenso für den mit ^3H -Thymidin gebildeten Anteil der DNS.

Im Durchschnitt ist daher die Markierungsintensität der Zellen nach der Teilung halb so groß, wie vor der Teilung. Daraus folgert, daß die markierten Tochterzellen des 2. Vorläufers, statistisch gesehen, die halbe Markierungsintensität der markierten Tochterzellen des 1. Vorläufers aufweisen. Errechnet man die Zeit, in der sich die Markierungsintensität einer bestimmten Fraktion von hochmarkierten Blutlymphozyten halbiert, ergibt sich eine weitere Möglichkeit die Generationszeit der Lymphozytenvorläuferzellen zu bestimmen; dies ist die Methode der Körnchenschwellenhalbierungszeit (6, 14)⁽⁺⁾.

Nach den vorher angestellten Überlegungen entspricht das Zeitintervall zwischen der ^3H -Thymidin-Injektion und dem Beginn der Markierungsindexanstiegs der Zeitspanne für die G2-Ruhephase und die Mitose, zuzüglich einer Ausschwemmzeit der Tochterzellen. Dieses Intervall beträgt in unserer Studie drei Stunden. Das bedeutet, daß die Zeitdauer für die G2-Ruhephase und die Mitose der Lymphozytenvorläuferzellen von Patienten mit Lymphogranulomatose weniger als 3 Stunden beträgt. Eine Studie über proliferierende Lymphozyten im Lymphgewebe von Patienten mit Lymphogranulomatose (26) berichtet von einer Minimaldauer der G2-Ruhephase und der Mitose von 100 Minuten. Dieser Wert stimmt mit unseren Ergebnissen gut überein.

Die Dauer des Einstroms von markierten Zellen entsprechend dem Anstieg des Markierungsindex, stimmte bei den kleinen, mittelgroßen und großen Lymphozyten weitgehend überein. Die daraus sich ergebende Zeit für die DNS-Synthesephase beträgt im Mittel 9 Stunden mit einer Breite von 6 - 15 Stunden. Diese Werte entsprechen den Daten, die mittels der

(+) Es gelten die bei (14) angeführten Bedingungen.

Doppelmarkierungsmethode in der oben erwähnten Studie (26) mit 8 - 13 Stunden bestimmt wurden und einer weiteren Studie, die etwa 7 Stunden für die DNS-Synthesephase der Lymphozyten bei Tumor-Patienten angibt (16).

Mittels der Abstände der beiden Gipfel in der Markierungsindexkurve kann die Zellzykluszeit der Lymphozytenvorläuferzellen auf 12 - 36 Stunden festgelegt werden, mit einem Mittel von 24 Stunden. Bei Patient H.A. ist die Bestimmung der Vorläufergenerationszeit nicht genau möglich, da bei ihm im entscheidenden Zeitraum zu wenig Proben vorliegen.

Mit der Methode der Körnchenschwellenhalbierungszeit (15, 18) konnten wir bei den Patienten M.F. und A.R. eine Generationszeit der Lymphozytenvorläuferzellen von 16 bzw. 23 Stunden ermitteln. Die Ergebnisse beider Methoden stimmen gut überein. Von anderen Untersuchern wurden die Zellzykluszeiten mit der Doppelmarkierungsmethode von proliferierenden Lymphozyten im lymphatischen Gewebe von Patienten mit Lymphogranulomatose mit 27 Stunden angegeben (27). In der gleichen Studie wurde für lymphopoetische Zellen im normalen lymphatischen Gewebe eine Generationszeit von 40 Stunden beschrieben, während in einer Untersuchung der Lymphe des Ductus thoracicus bei Patienten mit einer Autoimmunkrankheit mittels der Kurve von markierten Mitosen eine Generationszeit der großen, basophilen Zellen von 8 - 9 Stunden festgelegt wurde (31).

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit einen Vergleich der Generationszeit der Lymphozytenvorläufer mit dem Verhalten der durchschnittlichen Körnchenzahl pro markierter Zelle anzustellen. Hierzu ist zu berücksichtigen, daß die markierten Lymphozyten, die den ersten Gipfel in der Markierungsindexkurve bilden, von der ersten Vorläufergeneration

abstammen, die die den zweiten Gipfel bilden, stammen von der zweiten Vorläufergeneration ab. Da die Vorläuferzellen aus der zweiten Generation sich zweimal teilen und damit der Anteil an ^3H -Thymidin markierter DNS auf vier statt auf zwei Tochterzellen verteilt wird, wäre zu erwarten, daß die durchschnittliche Körnchenzahl der markierten Lymphozyten zum Zeitpunkt des zweiten Gipfels halb so groß ist, wie zum Zeitpunkt des ersten Gipfels. Da jedoch das durchschnittliche Verhältnis der Markierungsintensität von kleinen Lymphozyten beim ersten und zweiten Gipfel ungefähr 1,5 beträgt, ist zur Zeit des zweiten Gipfels ein Mischungsverhältnis von überlebenden Zellen des ersten Gipfels und neugeformten Zellen mit 0,5 zu 1 wahrscheinlich (s. Tab. 2). Unter diesen Bedingungen ist aber beim zweiten Gipfel eine durchschnittliche Körnchenzahl pro markierter Zelle von 67 % von der des ersten Gipfels zu erwarten. Die von uns festgestellten Werte in der Studie liegen für kleine Lymphozyten zwischen 62,4 % und 85,9 %, mit einem Mittel von 67,2 % bei den Patienten A.R., H.A. und M.F. (s. Tab. 2). Nur die Daten des Patienten H.L. entsprachen nicht dem erwarteten Körnchenmuster, was wohl auf den veränderten Thymidin-Metabolismus der Vorläuferzellen in der Regenerationsphase nach Zytostatika-Therapie beruht (7).

Patient	große			Lymphozyten mittelgroße			kleine		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A.R.	120	75	20	100	70	45	115	95	45
H.A.	70	60	15	50	40	30	50	40	15
M.F.	160	100	30	120	70	65	110	60	35
H.L.	90	95	24	90	90	36	85	90	35

Tabelle 2: Mittlere Körnchenzahl der markierten Blutlymphozyten zum Zeitpunkt des ersten (I) und des (II) Gipfel des Markierungsindex und zum Zeitpunkt der letzten markierten Probe (III).

Lymphozyten-Produktion:

Bezieht man die ermittelten Einstromraten auf die absoluten Lymphozytenzahlen von $345/\text{mm}^3$ Blut (H.L.), $700/\text{mm}^3$ Blut (A.R.), $1100/\text{mm}^3$ Blut (M.F.) und $1650/\text{mm}^3$ Blut (H.A.), so errechnet sich daraus eine Produktion von 61 (15 kleine, 12,5 mittelgroße und 33 große) Lymphozyten/ mm^3 Blut/Tag bei Patient H.A., von 107 (11,5 kleine, 47 mittelgroße und 48 große) Lymphozyten/ mm^3 Blut/Tag bei H.L., von 130 (29,5 kleine, 33 mittelgroße und 67,5 große) Lymphozyten/ mm^3 Blut/Tag bei A.R. und von 259 (22 kleine, 85,4 mittelgroße und 152 große) Lymphozyten/ mm^3 Blut/Tag bei M.F.. Mit Ausnahme des Patienten H.A. sind diese Werte signifikant höher als bei 4 Tumor-Patienten ohne hämatologische Erkrankung mit einer Produktion von 40 - 50 Lymphozyten/ mm^3 Blut/Tag (22, 27).

Die Produktion von Lymphozyten findet hauptsächlich im lymphatischen Gewebe statt. Doch zeigen sowohl die in-vitro-Bestimmungen als auch die ersten Proben nach ^3H -Thymidin-Injektionen, daß sich zusätzlich ein Teil der großen und mittelgroßen Lymphozyten im peripheren Blut in DNS-Synthese befindet.

Nach unseren ermittelten Daten nimmt die DNS-Synthesephase der Lymphozytenvorläuferzellen 40 % der gesamten Zellzykluszeit in Anspruch. Wenn wir annehmen, daß dieses Verhältnis auch für die proliferierenden Lymphozyten im peripheren Blut gilt, dann bedeutet das bei einem in-vitro-Index von durchschnittlich 7 % (3 - 13 %) bzw. 0,6 % (0,2 - 2 %), daß höchstens 20 % der großen und 5 % der mittelgroßen Lymphozyten im Blut proliferierende Zellen sind, während die Mehrheit ruhende Lymphozyten sind.

Die Bedeutung der Proliferation von Lymphozyten im peripheren Blut ist nicht völlig klar, in der Untersuchung hat sich jedoch ein relativ konstantes Verhältnis der Menge an proliferierenden Blutlymphozyten zur im Blut auftretenden absoluten Anzahl an neugebildeten Lymphozyten gezeigt (s. Tab. 3). Das könnte bedeuten, daß von der Konzentration von DNS-synthetisierenden Lymphozyten im peripheren Blut ein Rückschluß auf das Ausmaß der gesamten Lymphozytopoese möglich ist.

	A.R.	H.A.	M.F.	H.L.
I. Anzahl der DNS synthetisierenden Lymphozyten im Blut (markierte Zellen/mm ³)				
a. nach in vitro-Inkubation mit ³ H-Thymidin	6,7	4,5	28,6	7,9
b. direkt nach ³ H-Thymidin-injektion	10,2	6,1	26,4	7,7
c. Mittelwert	8,5	5,3	27,5	7,8
II. Anzahl der in den ersten Stunden nach ³ H-Thymidin-Injektion produzierten Blutlymphozyten (markierte Zellen/mm ³)				
a. 10 Stunden nach ³ H-Thymidin	50,6	19,0	132,0	43,2
b. 12 Stunden nach ³ H-Thymidin	49,4	27,4	134,0	57,0
c. Mittelwert	50,0	23,2	133,0	50,4
III. Verhältnis von Ic. : IIc.	1:5,9	1:4,4	1:4,8	1:6,4

Tabelle 3: Verhältnis der Anzahl an DNS-synthetisierenden Lymphozyten im Blut zur Gesamthöhe der Lymphozytenpoese.

Schlußfolgerung:

Wir sind ausgegangen von der Frage, beruht die Lymphopenie im peripheren Blut von Patienten, die an Lymphogranulomatose erkrankt sind, auf einer erhöhten Elimination v. Lymphozyten bzw. einer verkürzten Verweildauer im peripheren Blut oder ist sie die Folge einer verminderten Produktion von Lymphozyten

Die von uns mittels der ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung erhaltenen Werte zeigen, daß bei Patienten mit Lymphogranulomatose die Produktion von Blutlymphozyten gegenüber der von Personen mit soliden Tumoren (45 Lymphozyten/cmm Blut/Tag (22, 25) deutlich gesteigert ist. Das Ausmaß der Produktionssteigerung scheint dabei mit der Aktivität der Krankheit zu korrelieren; wir finden bei dem Patienten mit klinischen Stadium III A eine Lymphozytenneuproduktion von 61 Lymphozyten/mm³ Blut/Tag und bei den drei Patienten im klinischen Stadium IV B Werte zwischen 107 und 259 Lymphozyten/mm³ Blut/Tag.

Die Lymphozytenpopulation setzt sich dabei prinzipiell wie beim Gesunden (21, 24), aus zwei Fraktionen mit verschiedenem kinetischen Verhalten zusammen. Allerdings ist das Verhältnis dieser beiden Fraktionen deutlich zu ungunsten der langlebigeren Lymphozyten verschoben. Wir stellen wiederum bei den Patienten im klinischen Stadium IV B mit einem Anteil von 51,4 % bzw. 64,5 % langlebigere Lymphozyten eine signifikante Abweichung von der Norm mit 90,9 % langlebiger Lymphozyten fest (24). Zudem finden wir innerhalb unserer Studie keinen eindeutigen Hinweis auf eine Neubildung langlebiger Lymphozyten, da in den beiden Fällen, in denen wir die Studie über zwanzig Tage

hin durchführten, nach dem 18. bzw. nach dem 21. Tag keine markierten Lymphozyten mehr im peripheren Blut waren.

Die kurzlebigen Lymphozyten, die bei den Patienten mit Lymphogranulomatose einen bedeutend größeren Anteil der peripheren Lymphozyten-Population ausmachen, als das bei Normalpersonen der Fall ist, unterliegen außerdem noch einer schnelleren Elimination. Während sie sich bei Patienten mit soliden Tumoren überwiegend 12 Tage im peripheren Blut aufhalten (24), ergibt sich in unserer Untersuchung eine mittlere Verweildauer der kurzlebigen Lymphozyten von 1 - 5,5 Tagen.

Diese Daten bedeuten, daß die Lymphopenie bei Patienten mit Lymphogranulomatose nicht die Folge einer verminderten Gesamtproduktion von Lymphozyten ist, sondern die Folge der durchwegs raschen Elimination der neugebildeten Zellen ist.

Der entscheidende Faktor für die Aufrechterhaltung dieses Zustandes ist vermutlich die stark verminderte oder fehlende Neuproduktion langlebiger Lymphozyten. Da wir die Neubildung langlebiger Lymphozyten in unserer Untersuchung nicht eindeutig nachweisen konnten, konnten wir auch nicht die mittlere Verweildauer dieser Zellen bei unseren Patienten bestimmen. Nehmen wir an, sie entspräche der bei Normalpersonen gefundenen (1 - 1,5 Jahren) (8, 21), so würde das bedeuten, daß bei unseren Probanden zwischen 1 und 4 langlebigen Lymphozyten/mm³ Blut/Tag in das periphere Blut einströmen, bei Normalpersonen 5 langlebige Lymphozyten/mm³ Blut/Tag (24). Das würde bedeuten, daß ihr Anteil an der Gesamtproduktion von 12,5 % bei Normalpersonen auf 6,7 % bzw. 0,6 % zurückgeht.

Diese drastische Verminderung kann von der gesteigerten Produktion kurzlebiger Lymphozyten nicht ausgeglichen werden, wobei verstärkend hinzukommt, daß deren mittlere Verweildauer kürzer ist als bei gesunden Menschen.

Es scheint unter den beschriebenen Versuchsbedingungen möglich zu sein, ein genaueres Maß für die Aktivität der Erkrankung anzugeben. Während wir auf der einen Seite ein relativ konstantes Verhältnis der Anzahl der proliferierenden Zellen im peripheren Blut und Gesamtlymphozytenproduktion finden, können wir auf der anderen Seite feststellen, daß der Patient mit der aktivsten Krankheit (M.F.) die höchste Produktionsrate an Lymphozyten hat, während der einzige Patient mit inaktiver Lymphogranulomatose nur eine leicht gesteigerte Lymphozytopoese zeigt.

Diese Befunde bestätigen auf der einen Seite die von Huber et al. (12) gefundene Korrelation zwischen dem Auftreten von S-Phase-Zellen im peripheren Blut und der Aktivität der Erkrankung und auf der anderen Seite zeigen sie, daß die absolute Anzahl an S-Phase-Zellen im peripheren Blut umso größer ist, je ausgeprägter die Steigerung der Lymphozytenproduktion ist.

Kinetik der Monozyten bei Lymphogranulomatose:

Ergebnisse:

Die normale Monozytenzahl beträgt 100 - 600 Monozyten/mm³ Blut bzw. 2 - 6 % im Differentialblutbild (3). Im Vergleich dazu ergibt das Differentialblutbild unserer Probanden zum Zeitpunkt der Untersuchung 1,2 % Monozyten (A.R.), 1,6 % (H.L.), 5,2 % (H.A.) und 7,2 % (M.F.). Das entspricht einer absoluten Monozytenanzahl von 40 Monozyten/mm³ Blut (H.L.), 108 (A.R.), 335 (M.F.) und 775 (H.A.). Es liegen also bei den Patienten eine absolute und eine relative Monozytose und eine absolute und eine relative Monozytopenie vor.

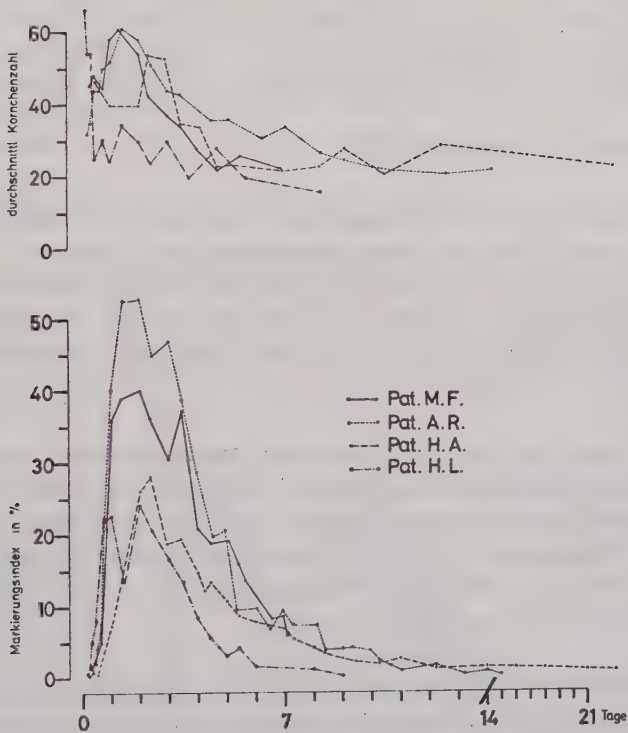
Nach der ³H-Thymidin-Pulsmarkierung erscheinen die ersten markierten Monozyten nach einem Zeitraum von 4 Stunden (H.L.), 5 Stunden (A.R.), 7 Stunden (M.F.) und 14 Stunden (H.A.) im peripheren Blut. Bei den Patienten A.R. und M.F. bleibt dann der prozentuale Anteil an markierten Monozyten bis zur 12. Stunde relativ niedrig. Danach erfolgt bei A.R., M.F. und H.A. zur 14. Stunde ein steiler Anstieg des Markierungsindex der Monozyten und dieser erreicht schließlich einen ersten Gipfel mit 24,0 % zur 18. Stunde (H.L.), mit 39,9 % zur 32. Stunde (M.F.), mit 52,6 % zur 34. Stunde (A.R.) und mit 28,0 % zur 48. Stunde (H.A.). Diesem ersten Gipfel folgen ein oder zwei weitere relative Gipfel mit einem Abstand von etwa 30 bis 40 Stunden. Die durchschnittlichen Körnchenzahlen pro Zellkern sind dabei deutlich rückläufig (s. Tab. 4).

Vom ersten Gipfel an fällt der Markierungsindex, unterbrochen von den relativen Gipfeln, zunächst steiler, später flacher ab. Die letzten markierten Monozyten wurden bei

A.R. nach 15 Tagen, bei H.L. nach 9 Tagen und bei H.A. nach 28 Tagen gefunden.

Patienten	A.R.		M.F.		H.L.		H.A.	
	Zeit	MCG	Zeit	MCG	Zeit	MCG	Zeit	MCG
1. Gipfel	34	61,0	32	60,5	18	30,4	48	40,0
2. Gipfel	72	44,0	83	34,0	48	30,0	82	35,0
3. Gipfel	118	30,0	120	21,0	--	----	106	22,0

Tabelle 4: Übersicht über die im Markierungsindex auftretenden Gipfel, dargestellt in Stunden nach ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung, in Korrelation mit der zu diesem Zeitpunkt durchschnittlichen Körnchenzahl pro markierten Zellkern. (MCG)



Figur 10: Oben: durchschnittliche Körnchenzahl pro markiertem Zellkern und
Unten: Verlauf des Markierungsindex in Abhängigkeit von der Zeit nach ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung bei den Monozyten der vier Patienten mit Lymphogranulomatose.

Diskussion:

Grundsätzlich gelten für die Bestimmung der kinetischen Daten der Monozyten die gleichen Voraussetzungen und Bedingungen, wie bei den Lymphozyten. Ebenso gelten die gleichen Einschränkungen für H.L., da bei ihm auch die Monozyten im Untersuchungszeitraum um 70 % anstiegen.

Umsatz der Blutmonozyten:

Im Gegensatz zu den Lymphozyten werden in den ersten Proben nach ^3H -Thymidin-Pulsmarkierung keine markierten Monozyten im peripheren Blut gefunden. Ebenso zeigen die in-vitro-Präparate keine markierten Monozyten, so daß wir annehmen können, daß sich im Blut keine proliferierenden Monozyten befinden.

Das steilste Stück des Anstiegs der Markierungsindexkurve zwischen dem ersten gehäuften Auftreten von markierten Monozyten und dem ersten Gipfel im Markierungsindex entspricht der Einstromrate. Für die Monozyten fanden wir Einstromraten von 0,7 % Monozyten/Stunde (H.A.)⁽⁺⁾, 2,57 % (M.F.), 2,58 % (H.L.) und 2,76 % (A.R.).

Die Einstromrate ist bei konstantem Zellniveau gleich der Umsatzrate. Die Umsatzzeit ergibt sich durch Extrapolieren der Umsatzrate auf hundert Prozent. Sie beträgt 36,2 Stunden (A.R.), 39,0 Stunden (M.F. und H.L.) und 127 Stunden (H.A.)⁽⁺⁾.

(+) Der Wert der Einstromrate von H.A. wird vermutlich unterschätzt und der der Umsatzzeit überschätzt, da bei diesem Patienten im entscheidenden Zeitraum zu wenig Proben vorhanden sind.

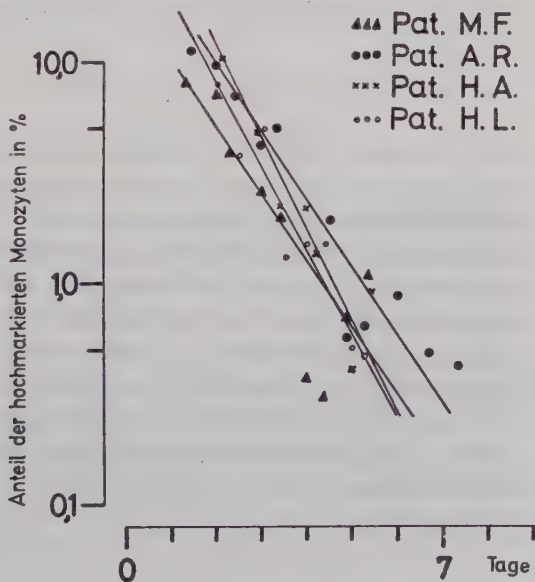
In anderen Studien, in denen die Einstromrate und die Umsatzzeit der Monozyten bei hämatologisch normalen Patienten untersucht wurden, wurden folgende Werte ermittelt: Einstromrate der Monozyten: 0,9 - 1,5 % / Stunde (10) und 0,98 % / Stunde (34); Umsatzzeit: 67,2 - 139,2 Stunden (10) und 102 Stunden (34). Nach diesen Werten ergibt sich bei Patienten mit Lymphogranulomatose eine kürzere Umsatzzeit und damit ein gesteigerter Monozytenumsatz im Vergleich zu hämatologisch normalen Patienten.

Elimination und Verweildauer der Monozyten im Blut:

Um zu untersuchen, ob die Monozyten das Blut nach statistischen Gesetzmäßigkeiten oder als Funktion ihres Alters verlassen, stellen wir den Abfall der Markierungsindexkurve von hochmarkierten Monozyten ab der 48. Stunde semilogarithmisch dar (6, 14) (s. Fig. 11).

Figur 11:

semilogarithmische Darstellung der Elimination der hochmarkierten Monozyten aus dem Blut.



Der Abfall des Markierungsindex verläuft auch bei den Monozyten nach einer einfachen, exponentiellen Funktion; daraus ergeben sich drei Folgerungen:

1. Die Monozyten verlassen das Blut nach dem 'random-loss-Prinzip', d.h. nach statistischen Gesetzmäßigkeiten.
2. Die Halbwertszeit dieses exponentiellen Abfalls beträgt 24 Stunden (A.R. und M.F.), 19 Stunden (H.L.) und 18 Stunden (H.A.) (s. Fig. 11).
3. Aus der Halbwertszeit ergibt sich eine mittlere Verweildauer der Monozyten im Blut von 34,7 Stunden (A.R. und M.F.), 27,4 Stunden (H.L.) und 26,0 Stunden (H.A.), nach der Formel: mittlere Verweildauer = Halbwertszeit/ $\ln 2$ (14).

Bei hämatologisch normalen Personen wurde eine Halbwertszeit von 18 - 27 Stunden gefunden (10). Danach beträgt die mittlere Verweildauer 26 bis 39 Stunden.

Kinetische Homogenität der Population der Blut-Monozyten:

Eine Zellpopulation ist kinetisch homogen, wenn mittlere Verweildauer und Umsatzzeit übereinstimmen. Dies ist bei den Patienten A.R. und M.F. gegeben (s. Tab. 5). Für die Diskrepanz der Werte bei H.L. und H.A. bieten sich folgende Erklärungen an: der Patient H.L. befindet sich in einer Regenerationsphase, die Anzahl der Zellen bleibt im Untersuchungszeitraum nicht konstant, folglich ist eine Übereinstimmung von Umsatzzeit und mittlerer Verweildauer nicht zu erwarten. Bei Patient H.A. wird wegen zu seltener Proben im entsprechenden Zeitraum die Einstromrate vermutlich unterschätzt.

Diese Vermutung kann überprüft werden, indem man die errechnete Einstromrate direkt auf die mittlere Verweildauer bezieht. Man erhält so einen Grenzwert auf der Basis der errechneten Werte. Im Idealfall müßte dieser Grenzwert, die asymptotische Aufsättigung, $= \frac{E \times T^{1/2}}{1 \ n \ 2}$ gleich hundert Prozent sein. Wir errechnen nun für die Patienten A.R. und M.F. eine asymptotische Aufsättigung von 96 % bzw. 89 %, während sie bei dem Patienten H.A. nur 48,5 % beträgt. Es erscheint so unwahrscheinlich, daß die Werte bei H.A. stimmen und bei ihm allein zwei kinetisch differente Fraktionen der Monozyten existieren.

	A.R.	M.F.	H.L.	H.A.	
Umsatzzeit	36,2	39,0	39,0	127	Stunden
Mittl. Verweildauer	34,7	34,7	27,4	26,0	Stunden

Tabelle 5: Vergleich der errechneten Umsatzzeit der Monozyten mit deren mittlerer Verweildauer im peripheren Blut.

Zykluszeiten der Monozyten-Vorläuferzellen:

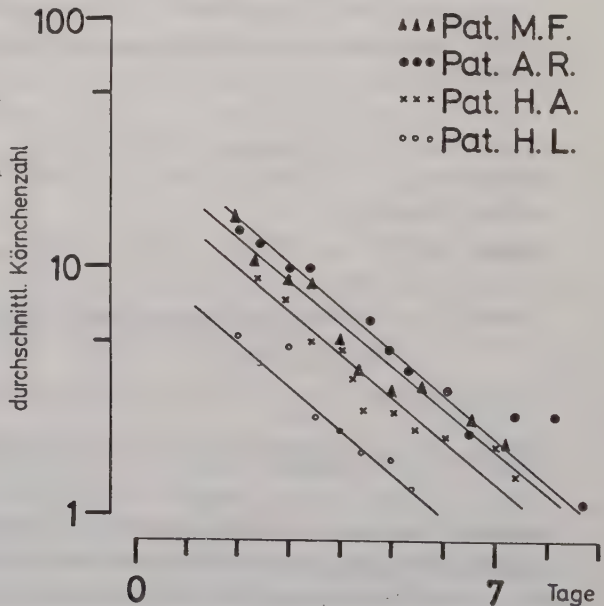
Entsprechend der bei den Lymphozyten angestellten Überlegungen über die Zykluszeiten der Vorläuferzellen (s. Fig. 10) ermittelten wir für die Summe der G2-Ruhephase, der Mitose und einer möglichen Reifungszeit einen unteren Grenzwert von 4 Stunden (H.L.), 5 Stunden (A.R.), 7 Stunden (M.F.) und 14 Stunden (H.A.), bestimmt durch das erste Auftreten einzelner markierter Monozyten im Blut. Eine deutliche Zunahme der markierten Monozyten setzt allerdings bei den Patienten (A.R., M.F., H.A.) zwischen der 12. und 14. Stunde ein, folglich dürfte der obere Grenz-

wert für die Dauer dieser drei Phasen bei 14 Stunden liegen.

Dieser Bereich wurde auch von anderen Autoren (10, 24) für Patienten ohne hämatologische Erkrankung errechnet.

Für die DNS-Synthesephase ergaben sich aus der Dauer des Anstiegs der Markierungsindexkurve 12 Stunden (H.L.), 22 Stunden (A.R., M.F.) und 36 Stunden (H.A.).

Figur 12:
semilogarithmische Darstellung der mittleren Körnchenzahl eines konstanten Prozentsatzes (20 %) an hochmarkierten Monozyten vom Zeitpunkt des ersten Gipfels an.



Die Messung der Abstände der Gipfel⁽⁺⁾ ergibt Generationszeiten von 30 Stunden (H.L.), 34 Stunden (H.A.), 38 Stunden

(+) Gemessen wird hier jeweils nur der Abstand zwischen den ersten beiden Gipfeln, da hier durch die Häufigkeit der Proben der Abstand am genauesten ermittelt werden kann.

den (A.R.) und 51 Stunden (M.F.) (s. Tab. 4). Der daraus errechnete Mittelwert von 38,3 Stunden stimmt gut mit dem mittels der Körnchenschwellenhalbierungsmethode gefundenen Mittelwert von 41,5 Stunden, zusammengesetzt aus 41 Stunden bei A.R. und H.L. und 42 Stunden bei M.F. und H.A., überein (s. Fig. 12).

Von anderen Autoren werden für Patienten ohne hämatologische Erkrankung folgende Generationszeiten der Monozytenvorläufer angegeben:

- 2 - 3 Tage, geschätzt mittels der Körnchenklassenmethode (10)
- 40 - 82 Stunden, bestimmt aufgrund des Abfalls der mittleren Körnchenzahl aller markierten Zellen (34)
- 29 Stunden, ermittelt anhand eines Modells der Monozytopoese (19).

Die von uns gefundenen Zeiten liegen zwischen den in der Literatur angegebenen Werten. Demzufolge läßt sich keine Änderung der Generationszeiten der Monozytenvorläuferzellen bei Patienten mit Lymphogranulomatose gegenüber hämatologisch normalen Patienten feststellen.

Monozyten-Produktion:

Geht man von den ermittelten Einstromraten aus, ist es unter Einbeziehung der absoluten Leukozytenzahlen und der Differentialblutbilder mit Hilfe der folgenden Formel möglich, den absoluten täglichen Einstrom an Monozyten ins zirkulierende Blutkompartiment zu errechnen (14):

täglicher Einstrom an Monozyten =

$$\begin{array}{l} \text{Prozentsatz der pro} \\ \text{Stunde erneuerten} \\ \text{Monozyten} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{absolute Mono-} \\ \text{zytenzahl/ml} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{Blutvolumen} \\ \text{in ml (+)} \\ \text{n.Seite} \end{array} \times \frac{24}{100}$$

Entsprechend dieser Formel ergab sich ein absoluter Monozyteneinstrom ins periphere Blut von $10,64 \times 10^8$ Monozyten/Tag für M.F., $7,23 \times 10^8$ Monozyten/Tag für H.A., $2,52 \times 10^8$ Monozyten/Tag für A.R. und $1,32 \times 10^8$ Monozyten/Tag für H.L. In einer Arbeit über Patienten ohne hämatologische Erkrankungen (34) wurde ein absoluter Monozyteneinstrom von $9,4 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^8$ Monozyten/Tag errechnet. Da diese Zahlen in der gleichen Größenordnung wie unsere liegen, ist anzunehmen, daß der Einstrom an Monozyten pro Tag und damit auch die tägliche Produktion von Monozyten im Knochenmark bei Patienten mit Lymphogranulomatose nicht wesentlich von denen hämatologisch normaler Personen abweicht.

(+) von Vorseite: Das Blutvolumen errechneten wir nach einer Formel, die von der Größe und dem Gewicht des Patienten unter Berücksichtigung des Geschlechts ausgeht (20).

Schlußfolgerung:

Die von uns gefundenen Werte über das kinetische Verhalten der Monozyten bei Patienten mit Lymphogranulomatose entsprechen weitgehend denen, die bei Patienten ohne hämatologische Erkrankungen gefunden wurden. Ein Unterschied scheint allerdings bei der Umsatzrate, bzw. den Umsatzzeiten zu bestehen. Fliedner ermittelte für die Umsatzrate der Monozyten $0,9\% - 1,5\% / h$ und für die Umsatzzeit 67 - 140 Stunden (10) und Whitelaw fand $0,98\% / h$ bzw. 102 Stunden (34) bei Patienten ohne hämatologische Erkrankung. Drei unserer Patienten weisen dagegen eine Umsatzrate zwischen $2,57\%$ und $2,76\%$ auf und damit Umsatzzeiten von 36 - 39 Stunden, die Werte des Patienten H.A., bei denen wir allerdings starke Ungenauigkeiten vermuten, liegen in dem von Fliedner und Whitelaw angegebenen Bereich.

Aufgrund dieser Zahlen können wir annehmen, daß bei Patienten mit Lymphogranulomatose ein gesteigerter Umsatz der Monozyten existiert, ähnlich wie er als unspezifische Entzündungsreaktion beschrieben wird (19).

Trotzdem ist diese Annahme kritisch zu betrachten. Whitelaw untersuchte in seiner Studie Patienten, deren absolute Monozytenwerte bei 400 - 1490 Monozyten/cmm Blut lagen (34). Unsere Patienten haben dagegen 108 bis 775 Monozyten/cmm Blut, wenn man von dem bis vor kurzem zytostatisch behandelten Patienten H.L. absieht. Von Begemann (3) werden die Monozytenwerte für Normalpersonen mit 100 - 600 Monozyten/cmm Blut bzw. $2 - 6\%$ im Differentialblutbild angegeben. Whitelaw geht also offensichtlich in seiner Untersuchung von sehr hohen Normwerten aus.

Bei Fliedners Untersuchung dagegen steht der Umsatzzeit

von 67 - 140 Stunden eine mittlere Verweildauer von 18 - 27 Stunden gegenüber (10). Demnach müßte dort die Population der Monozyten kinetisch inhomogen sein. Ein endgültiger Schluß kann also aufgrund dieser Daten noch nicht gezogen werden.

Zusammenfassung:

Bei vier Patienten mit Lymphogranulomatose (Stadium III A und IV B) wird die Kinetik der Lymphozyten und Monozyten mittels einer einmaligen Injektion von ^3H -Thymidin (0,15 $\mu\text{C/g}$ Körpergewicht) autoradiographisch untersucht.

Wir teilten die Lymphozyten in drei Kategorien ein, kleine Lymphozyten (bis 8,4 μ), mittelgroße Lymphozyten (8,5 bis 9,9 μ) und große Lymphozyten (ab 10 μ). Während bei den kleinen Lymphozyten mit Umsatzzeiten zwischen 10 und 66 Tagen und einer mittleren Verweildauer von 2,3 bis 10,6 Tagen aufgrund dieser Diskrepanz zwei kinetisch differente Fraktionen angenommen werden müssen, erscheinen die großen Lymphozyten mit Umsatzzeiten zwischen 1 und 3,2 Tagen und einer mittleren Verweildauer von 1,2 bis 2,7 Tagen kinetisch homogen. Im Gegensatz zu Personen ohne hämatologische Erkrankung ist der Gesamtanteil an kurzlebigen Lymphozyten mit 10,0 %, 35,5 % und 48,6 % deutlich erhöht.

Die Zellzykluszeiten der Vorläuferzellen der Lymphozyten können wir bei 12 - 36 Stunden mit einem Mittel von 24 Stunden angeben. Hierbei nimmt die DNS-Synthesephase mit durchschnittlich 9 Stunden rund 40 % der Zeit in Anspruch.

Die gesamte Neuproduktion von Lymphozyten liegt bei unseren Patienten bei 61, 107, 130 bzw. 259 Lymphozyten/ mm^3 Blut/Tag und ist erheblich höher als normal. Dies basiert ausschließlich auf einer gesteigerten Produktion von kurzlebigen Lymphozyten, deren Verweildauer im Blut gegenüber der von Normalpersonen verkürzt ist. Die Lymphopenie bei Lymphogranulomatose ist eine Folge der verminderten Anzahl langlebiger Lymphozyten.

Die Produktion von kurzlebigen Lymphozyten ist bei den Patienten am deutlichsten gesteigert, deren Krankheit besonders aktiv ist. Gleichzeitig scheint eine Korrelation zwischen der Anzahl der proliferierenden Zellen im peripheren Blut und der Gesamtproduktion von Lymphozyten zu bestehen, so daß sich hier möglicherweise ein weiterer diagnostischer Hinweis auf die Aktivität der Erkrankung gewinnen läßt.

Die Monozyten weisen keine Diskrepanz von Umsatzzeit (36 - 39 Stunden) und mittlerer Verweildauer (26 - 35 Stunden) auf und erscheinen somit kinetisch homogen. Die Zellenzykluszeiten der Monozytenvorläuferzellen liegen zwischen 34 und 51 Stunden mit einem Mittel von 41 Stunden. Die DNS-Synthesephase dauert dabei rund 22 Stunden. Die Monozytenproduktion beträgt $1,32 \times 10^8$ - $10,64 \times 10^8$ Monozyten/Tag und liegt damit in dem gleichen Größenbereich, wie er für Patienten ohne hämatologische Erkrankung angegeben wird.

Von diesen Werten weicht nur die Umsatzzeit von der Norm (67 - 140 Stunden) ab. Ob dies ein Hinweis darauf sein könnte, daß der Umsatz der Monozyten bei Patienten mit Lymphogranulomatose entsprechend einer unspezifischen Entzündungsreaktion gesteigert ist, kann derzeit noch nicht entschieden werden.

Literatur:

- (1) Aisenberg, A.C., Lymphocytopenia in Hodgkin's Disease, Blood 25, 1037 (1965)
- (2) Aisenberg, A.C., Manifestations of Immunologic Unresponsiveness in Hodgkin's Disease, Cancer Research 26, Part 1, 1152 - 1160 (1966)
- (3) Begemann, H., J. Raststetter, W. Kaboth, Klinische Hämatologie, (1970) Stuttgart Thieme Verlag
- (4) Bouroncle, B.A., Sternberg-Reed Cells in the Peripheral Blood of Patients with Hodgkin's Disease, Blood 27, 544 - 556 (1966)
- (5) Bunting, C.H., The Blood Picture in Hodgkin's Disease, Bull. John Hopkins Hosp. 25, 173 - 177 (1917)
- (6) Clarkson, B., T. Ohkita, K. Ota, J. Fried, Studies of cellular proliferation in human leukemia. I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine, J. Clin. Invest. 46, 506 (1967)
- (7) Cleaver, J.E., Thymidine metabolism and cell kinetics, (1967) Amsterdam
- (8) Brown, W.M., K. Buckton, A.S. McLean, Quantitative studies of chromosome aberration in man following acute and chronic exposure to X-rays and gamma rays,

Lancet I, 1239 (1965)

- (9) Cronkite, E.P., V.P. Bond, T.M. Fliedner, J.R. Rubini, The use of tritiated Thymidine in the Study of DNA Synthesis and Cell Turnover in Hemopoietic Tissues, Lab. Invest. 8, 263 (1959)
- (10) Fliedner, T.M., Laeger, F. und Cronkite, E.P., Zyto-kinetische Untersuchungen an menschlichen Blutmonozyten, Der Monozyt (1969)
- (11) Haile, M.R., Eibergen, R., Nieweg, H.O., Observations on Abnormal Cells in the Peripheral Blood and Spleen in Hodgkin's Disease, British Medical Journal 1972/2
- (12) Huber, Chr., H. Huber, F. Schmalzl, B. Lederer, D. Bütterich, H. Braunsteiner, DNS-Synthese in Blut-Lymphozyten beim malignen Lymphogranulom, Acta Haemat 44, 222 (1970)
- (13) Huhn, D., H.G. Heinze, Ch. Steidle, Diagnose und Therapie bei Morbus Hodgkin, Münchner Medizin, Wschr. 115 (1973)
- (14) Killmann, S.A., Acute leukemia: The kinetics of leukemic blast cells in man, Ser. Haemat. 3, 38 (1968)
- (15) Killmann, S.A., E.P. Cronkite, J.S. Robertson, T.M. Fliedner, V.P. Bond, Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labelling in human beings in vivo with tritiated thymidine, Lab. Invest. 12, 671 (1963)

- (16) Klein, H.O., K.J. Lennartz, R. Gross, M. Eder, R. Fischer, In-vivo und in-vitro-Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen, Dtsch. Med. Wschr. 97, 1273 (1972)
- (17) Klima, R., Grundlagen für eine Neuordnung der Hämatologie zellulärer Reaktion im lymphatischen Apparat, Zeitschr. Inn. Med. 33, 125 (1952) Wien
- (18) Mauer, A.M., V. Fischer, Characteristics of cell proliferation in four patients with untreated acute leukemia, Blood 28, 428 (1966)
- (19) Meuret, G., Monozytopenie und Kinetik der Blutmonozyten beim Menschen, Blut 26, 6 (1972)
- (20) Nadler, S.B., J.U. Hidalgo, T. Bloch, Prediction of Blood Volume in Normal Human Adults, Surgery 51, 2 (1962)
- (21) Normann, A., M. S. Sasaki, R.E. Ottoman, A.G. Fingerhut, Lymphocyte lifetime in women, Science 147, 745 (1965)
- (22) Parwaresch, M.R., Unveröffentlichte Befunde
- (23) Sandberg, A., G.E. Moore, J.R. Schuberg, Atypical cells in the blood of cancer patients differentiation of tumor cells, J. nat. Cancer Inst. 22, 555 (1959)
- (24) Schick, P., Lymphocytenkinetik bei lymphatischen Systemerkrankungen (chronische lymphatische Leukämie, Lymphgranulomatose)

Verhandl. der Dtsch. Gesellschaft
für innere Med. 79, 154 - 158 (1973)

- (25) Schick, P., F. Trepel, Unveröffentlichte Befunde
- (26) Schiffer, L.M., Human lymphocyte proliferation,
DNA synthesis time, Cell Tissue Ki-
net. 4, 585 (1971)
- (27) Schiffer, L.M., D.A. Migliorato, Characterization
of one human lymphocyte population,
Amer. Soc. Hemat., abstr. vol. p.
7 (1971)
- (28) Sternberg, C., Über eine eigenartige, unter dem
Bilde der Pseudoleukämie verlaufen-
de Tuberkulose des lymphatischen
Apparates, Zeitschr. Heilk. 19, 21 -
90 (1898)
- (29) Stofberg, A.M.M., The significance of the leukocyte
concentrate in the demonstration
of tumor cells in the blood, Acta
haemat. 29, 65 - 79 (1963)
- (30) Swan, H.T., J. Knowelden, Prognosis in Hodgkin's Di-
sease related to the lymphocyte
count, J. of Haemat. 21, 343 (1971)
- (31) Wagner, H.P., L. Eckmann, Proliferative characteri-
stics of thoracic duct lymphoid
cells in man, XIII. Internat. Con-
gress of Hemat., abstr. vol. p. 206
(1970)
- (32) Wisemann, B.K., Blood picture in primary diseases
of lymphatic system; their charak-
ter and significance, J. Amer. med.
Ass. 107, 2016 (1936)

- (33) Wislawska-Orlowska, B., Numbers of lymphocytes in the peripheral blood, histopathologic changes and clinical symptoms in malignant lymphogranulomatosis, Acta Med. Pol. 10, 56 (1969)
- (34) Whitelaw, D.M., Observations on human monocyte kinetics after pulse labelling, Cell Tissue Kinet. 5, 311 - 317 (1972)

Herrn Professor Dr. Begemann danke ich für die Überlassung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, die Einrichtungen des Hämatologischen Labors seiner Klinik zu benutzen.

Bei der technischen Durchführung leistete mir Herr Dr. P. Schick Beistand; seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Kritik erleichterten mir wesentlich die Einarbeitung in die Thematik.

Lebenslauf

Am 8. März 1947 wurde ich, Peter Trumpp, in München als zweites Kind von Dr. med. Rolf Trumpp und seiner Frau Hansigret Trumpp geboren. Bis 1954 lebten wir in München. Von 1954 bis 1957 besuchte ich an meinem damaligen Wohnort Hopfen am See die Volksschule. Von 1957 bis 1966 ging ich auf das naturwissenschaftliche Gymnasium in Füssen. 1966 begann ich das Medizinstudium an der Universität München, das ich auch dort 1973 mit dem Staatsexamen abschloß. 1972 heiratete ich Sybille von Eicken.

Ich famulierte in der internen Abteilung von Professor Begemann im Krankenhaus München Schwabing, in der internen Abteilung des Krankenhauses St. Vinzenz in Pfronten und in der II. Kinderabteilung im Schwabinger Krankenhaus bei Dr. Schweier. Vom 1. September 1973 bis zum 28. Februar 1974 war ich Medizinalassistent an der Medizinischen Poliklinik der Universität München bei Professor Zöllner, anschließend bis zum 30. Juni 1974 an der Chirurgischen Universitätsklinik bei Professor Heberer und vom 1. September 1974 bis zum 31. Dezember 1974 in der II. Kinderabteilung im Schwabinger Krankenhaus. Am 4. Februar 1975 wurde mir vom Bayrischen Staatsministerium des Inneren die Approbation als Arzt erteilt.

